

EXPOSIÇÃO E ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM PLANTAS DE COLZA

Brassica napus L.

Inês Isabel Barata Leitão

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Coorientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

Presidente: Doutora Elizabeth Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Ana Maria Garcia Henriques Barreiros Joanaz de Melo, Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa.

Agradecimentos

Para que a realização desta dissertação fosse possível, foram essenciais as pessoas que me acompanharam nesta etapa do meu percurso académico.

Agradeço aos meus orientadores Professora Doutora Maria Luísa Louro Martins e Professor Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato pelo apoio que desde cedo demonstraram na elaboração desta dissertação, e acima de tudo pelo conhecimento que me transmitiram ao longo do meu percurso no Instituto Superior de Agronomia. Não esquecendo todos os esclarecimentos de dúvidas e as revisões de texto e bibliográficas no período de realização deste trabalho.

À Joana Sales que desde o início do trabalho de laboratório me apoiou e orientou de forma incansável, cedendo o seu tempo para me acompanhar nos vários momentos dos ensaios e colheitas. Agradeço-lhe ainda, a ajuda durante a análise de resultados e na resolução dos problemas encontrados e também o incentivo e compreensão, dada a minha restrição de tempo.

Às minhas colegas do laboratório 17A, Filipa Pinto e Inês Moreira por todo o apoio nas minhas tarefas de laboratório e nas colheitas ao longo do ensaio e também na revisão teórica do trabalho final.

Agradeço aos meus amigos mais próximos, que sempre mostraram interesse em saber como estavam as minhas "couves" e que me apoiaram nos momentos de maior stresse.

Não posso deixar de agradecer à equipa da EPCA que sempre me incentivou na realização deste trabalho e pela compreensão no tempo que precisei de dispensar para a realização da parte experimental.

Agradeço aos meus pais, peças imprescindíveis na minha vida, os valores que me transmitiram e o apoio incondicional tornando possível todo o meu percurso académico. E claro, à minha irmã Guigas pela amizade e ajuda na realização da parte experimental deste trabalho.

Agradeço ao meu namorado Tomás por todo o bom humor, incentivo, paciência e amizade, que demonstrou ao longo deste período, e que foram essenciais para que tudo corresse de forma positiva. Agradeço-lhe também a companhia nas idas ao Horto e a ajuda na rega dos fins-de-semana!

Por fim, gostaria de dedicar este trabalho às minhas Avós Felisbela e Carmelina, e ao Avô Alfredo, que infelizmente não me podem ver terminar esta etapa da minha vida.

Resumo

No presente trabalho foram avaliados os efeitos e a resposta ao stresse induzido pelos elementos potencialmente tóxicos, arsénio, cádmio e cobre e pela salinidade nas plantas de colza, com o objetivo de perceber qual o potencial da colza na fitorremediação.

Foram avaliados os parâmetros fisiológicos biomassa e a percentagem de matéria seca de caules e folhas. Avaliou-se também o teor de clorofila pelo método *Hansatech*.

As alterações na biomassa foram mais evidentes nas modalidades de As e NaCl. O teor de clorofila das plantas expostas a Cu e Cd revelaram-se muito baixos, resultado que se revelou através de plantas com sinais evidentes de necroses e cloroses.

As concentrações de MDA e de H_2O_2 revelaram um comportamento heterogéneo, destacando-se com maior concentração de MDA as plantas de colza com Cu e NaCl e maior concentração de H_2O_2 as modalidade As e NaCl.

O conteúdo mineral das plantas teve variações entre as modalidades, em particular a absorção do mineral ferro foi afetada pela presença dos EPT.

As concentrações dos EPT e NaCl foram determinadas ao nível dos cilindros de substratos, caules, folhas e sementes.

Palavras-chave: *Brassica napus*, cobre, cádmio, arsénio, salinidade, fitorremediação.

Abstract

The main objective of this work was to evaluate the effects and the response to stress induced by potentially toxic elements, arsenic, cadmium and copper by salinity in rapeseed plants, aiming to realize the potential of rapeseed in phytoremediation.

The physiological parameters like biomass and the percentage of dry matter of stems and leaves were evaluated. It was also evaluated the chlorophyll content by Hansatech method.

Changes in biomass were more evident in terms of As and NaCl contamination. The chlorophyll content of plants exposed to Cu and Cd proved to be very low, a result that was revealed through plants with obvious signs of necrosis and chlorosis.

The concentrations of MDA and H₂O₂ revealed a heterogeneous behavior, especially with the higher concentration of MDA rape plants with Cu and NaCl and the highest concentration of H₂O₂ in the NaCl experiment.

The mineral content of the plant was different in the various experiments, particularly the absorption of iron was affected by the presence of the PTE.

The concentrations of PTE and NaCl were determined at the level of substrate, stems, leaves and seeds.

Keywords: *Brassica napus*, copper, cadmium, arsenic, salinity, phytoremediation.

Extended Abstract

During all their life, plants are exposed to conditions of oxidative stress and its origin can be biotic (caused by another organisms) or abiotic (caused by the exposure to potentially toxic elements, high salinity, temperature and other environmental factors). This occurs due to the disequilibrium between the production and removal of reactive oxygen species (ROS).

The production of ROS may damage some of the fundamental constituents through oxidative reactions, such as lipid peroxidation, changes in proteins and damages to DNA and RNA. ROS also affect the metabolic processes like breathing, photosynthesis, CO₂ fixation, etc.

Heavy metals and metalloids are potentially toxic elements (PTE) that occur naturally in the soil. However, the majority of these elements are present in the soil due to the contamination resultant of anthropogenic activity.

The soil salinity is considered to be a serious problem in arid and semi-arid regions, where it limits the agricultural productivity and reduces the crop productivity. Particularly in Portugal the intrusion of sea water is considered a serious problem.

In this project, irrigation experiments were conducted in order to evaluate the rapeseed's response to the stress induced by PTEs and NaCl.

In the irrigation experiments, that lasted for 108 days (including 88 days under the induced stress), Cd (50 µM), As (50 µM), Cu (100 µM) and NaCl (25 mM) were applied separately in order to study the biomass and dry matter content. The concentration of chlorophyll, Zn, Cu, Mn, Fe, Ca, Mg, K, Na (mineral content) and the concentration of produced MDA and H₂O₂ were also determined for all plants in this work.

The addition of PTEs and NaCl negatively affected the plants biomass throughout the experiments, where the NaCl experiment showed the lower quantity of biomass followed by the As experiment. Regarding the dry matter content, in the presence of PTE and NaCl this parameter exhibited an increasing trend throughout the experiments. About the chlorophyll content, it was observed a significant decrease in the plants contaminated by Cd and Cu, evidenced by the manifestation of chlorosis in the leaf samples.

Cadmium and copper don't seem to affect the production of H₂O₂, unlike the elements As and NaCl that increased the production of this reactive oxygen species. In case of MDA, the Cu and NaCl experiments revealed greater values of MDA and it was observed a higher value of MDA last sampling - day 46, indicating a possible increased lipid peroxidation in longer exposure.

The rapeseed plants exposed to NaCl and to As showed visible changes in their growth and development in the initial phase, where they revealed a reduced growth and smaller leaves, with a dark green colouring.

By analysing the mineral composition, the absorbed Cd appears to affect the absorption of Zn in the leaves and stems, and Fe in stems, stimulating the absorption of Na, K, Ca, Mg, Mn and Cu. In the experiments with Cu, this element affects the concentration of the mineral Fe throughout the plant, and increases the concentration of other minerals. In turn the experience with As seems to affect the concentration of Zn, Mn and Fe in the leaves and stems and Ca only in stems. Accumulating over Na and Cu throughout the entire plant. Regarding to NaCl' experiment, it affects the concentration of Mn and Cu in leaves while keeping the remaining minerals similar to control. In the stems, there is a decrease in K, Ca, Mg and Mn. These results confirm, therefore, that PET and NaCl can in some cases influence the nutrition value of the rapeseed plants.

The seeds collected in the last day of experiment (108) showed a potential accumulation of Cd, Na and As. Regarding to the plant seeds contaminated by Cu, these plants did not produced seeds.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Extended Abstract	iv
Índice Geral.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Quadros	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Elementos minerais nas plantas.....	2
2.2. Metais pesados	4
2.2.1. Metais pesados e a contaminação dos solos	5
2.2.2. Metais pesados, acumulação em plantas e toxicidade	6
2.2.3. Iões metálicos e metabolismo secundário	7
2.2.4. Arsénio: Origem e comportamento nas plantas.....	8
2.2.5. Cádmio: Origem e comportamento nas plantas.....	9
2.2.6. Cobre: Origem e comportamento nas plantas	10
2.3. Stresse Oxidativo	12
2.3.1. Produção de ERO	12
2.3.2. Mecanismos de defesa das plantas	13
2.4. A salinidade e o sistema solo-planta	14
2.5. Solos contaminados e Fitorremediação.....	16
2.6. A cultura da colza.....	21
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Ensaio de rega	23
3.2. Colheita das amostras.....	24
3.3. Determinações analíticas nas plantas de colza	26
3.4. Determinações em Material Seco.....	26
3.4.1. Teor de matéria seca	26
3.4.2. Conteúdo mineral das plantas de colza.....	26
3.4.3. Determinação dos elementos nas sementes de <i>Brassica napus</i>	27
3.4.4. Determinação dos elementos no substrato	28

3.5.	Determinações em Material Fresco.....	29
3.5.1.	Determinação da Peroxidação de Lípidos	29
3.5.2.	Determinação do Peróxido de Hidrogénio (H ₂ O ₂).....	29
3.6.	Tratamento Estatístico	31
4.	Resultados e Discussão.....	32
4.1.	Germinação e desenvolvimento das plantas de colza	32
4.2.	Efeitos dos EPT e Salinidade nos parâmetros fisiológicos	34
4.2.1.	Biomassa	34
4.2.2.	Teor de Matéria Seca das Folhas e Caules.....	36
4.3.	Efeitos dos EPT e Salinidade no Teor de clorofila – <i>Hansatech</i>	38
4.4.	Avaliação do conteúdo mineral	40
4.4.1.	Conteúdo mineral no substrato	40
4.4.2.	Conteúdo mineral nas plantas de colza – Caules, Folhas e Sementes	42
4.4.2.1.	Arsénio	43
4.4.2.2.	Cádmio.....	44
4.4.2.3.	Cálcio	46
4.4.2.4.	Cobre	48
4.4.2.5.	Ferro.....	50
4.4.2.6.	Magnésio.....	52
4.4.2.7.	Manganês.....	54
4.4.2.8.	Potássio.....	56
4.4.2.9.	Sódio	58
4.4.2.10.	Zinco	60
4.5.	Avaliação do efeito da contaminação na peroxidação de lípidos	62
4.6.	Avaliação do efeito da contaminação na produção de peróxido de hidrogénio.....	63
5.	Conclusões	65
5.1.	Propostas Futuras.....	68
6.	Referências Bibliográficas	69

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema de resposta à salinidade em duas fases de crescimento (Adaptado de Fageria et al., 2011.)	15
Figura 2 - Absorção de metal por três grupos diferentes de plantas (Adaptado de Fageria et al., 2011).	18
Figura 3 - Ilustração de Brassica napus L.: vagem com sementes (esquerda), ramo com folhas e inflorescências (centro); caule e raiz (direita). (Adaptado de Larousse, 2013)	21
Figura 4 - Ilustração das fases de desenvolvimento da colza (Adaptado de Ferreira, 2009).	22
Figura 5 - Diagrama de ações de cada colheita para determinações analíticas.	26
Figura 6 - Diagrama representativo da digestão ácida dos substratos.	28
Figura 7 - Memória fotográfica representativa da germinação (1), aparecimento de cotilédones (2) e primeira folha (3).	32
Figura 8 - Evolução das plantas de colza durante o período de ensaio de rega.	33
Figura 9 - Biomassa média das plantas em estudo ao longo de 18, 30, 39 e 46 dias de contaminação.	34
Figura 10 - Teor de matéria seca (%) nas folhas e caules no período de exposição (46 dias)	36
Figura 11 - Teor médio de clorofila (sem unidades), para os ensaios dos vários elementos adicionados durante 46 dias.	38
Figura 12 - Efeitos da contaminação com os elementos em estudo nas plantas de colza (folhas).	39
Figura 13 - Concentração dos elementos Cd, As nos substratos.	40
Figura 14 - Concentração dos elementos Cu e Na nos substratos.	41
Figura 15 - Teor de As (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	43
Figura 16 - Teor de Cd (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	44
Figura 17 - Teor de Ca (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	46
Figura 18 - Teor de Cu (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	48
Figura 19 - Teor de Fe (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	50
Figura 20 - Teor de Mg (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.	52

Figura 21 - Teor de Mn (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.....	54
Figura 22 - Teor de K (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.....	56
Figura 23 - Teor de Na (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.....	58
Figura 24 - Teor de Zn (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação.....	60
Figura 25 - Concentração média de MDA formado nas folhas das plantas em estudo após contaminação com Cu, Cd, As e NaCl, durante 46 dias	62
Figura 26 – Concentração média de H ₂ O ₂ produzido nas folhas das plantas de colza, após contaminação com Cu, Cd, As e NaCl, durante 46 dias de exposição.	63

Índice de Quadros

Quadro 1 – Gamas de valores para o teor de nutrientes (macro e micro) nas plantas. Adaptado de Varennes, 2003.	2
Quadro 2 - Valores de concentração de alguns elementos vestigiais no solo e valores que indicam contaminação (Adaptado de Varennes, 2003).....	6
Quadro 3 - Tolerância Relativa de Culturas à Salinidade (Adaptado de Fageria <i>et al.</i> , 2011).	16
Quadro 4 - Limites de metais tóxicos admissíveis de acordo com a legislação em vigor.....	17
Quadro 5 - Composição da Solução Nutritiva de Hoagland utilizada no ensaio de rega.....	24
Quadro 6 - Número substratos retiradas de cada situação experimental nas colheitas.	25
Quadro 7 - Efeito dos EPT e da Salinidade no teor mineral das folhas.....	66
Quadro 8 - Efeito dos EPT e da Salinidade no teor mineral dos caules.....	67

Lista de Abreviaturas

$^1\text{O}_2$ - Singleto de Oxigénio

CAM – Metabolismo ácido das crassuláceas (em inglês – CAM Crassulacean acid metabolism)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (em inglês - DNA Deoxyribonucleic Acid)

EPT - Elementos Potencialmente Tóxicos (em inglês - PTE Potentially Toxic Elements)

ERO - Espécies Reativas de Oxigénio (em inglês - ROS - Reactive Oxygen Species)

LM - Limite Máximo

MDA - Malondialdeído

MS - Matéria Seca

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - Superóxido

OH^\bullet - Radical hidroxilo

PF - Peso Fresco

PS - Peso Seco

RNA - Ácido ribonucleico (em inglês - RNA Ribonucleic Acid)

T - Testemunha

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TCA - Ácido Tricloroacético

VMA - Valor Máximo Admissível

ϵ - Coeficiente de absorvidade molar

p/v - Relação peso volume

1. Introdução

A contaminação dos solos com quantidades tóxicas de metais e consequentemente a contaminação de plantas constitui uma preocupação para a saúde pública e para o ambiente.

A contaminação dos solos e da água de rega e/ou subterrânea advém principalmente do controlo ineficaz de processos que são assumidamente fontes emissoras de poluentes e de eventuais contaminantes (indústria, agricultura intensiva, poluição atmosférica, entre outras). No entanto, estes problemas podem ser atenuados com recurso a técnicas de remediação de solos com recurso a plantas, como o caso da fitorremediação.

A presente dissertação tem como objetivo principal abordar a temática dos metais tóxicos na vertente ambiental, nomeadamente no estudo do stresse oxidativo induzido por arsénio, cádmio e cobre em plantas de Colza (*Brassica Napus*). A escolha desta espécie deve-se à sua tolerância aos metais tóxicos, tendo também em conta a sua utilização na produção de biocombustíveis, não esquecendo o seu aproveitamento enquanto forragem para a alimentação animal (Ferreira, 2009). É também objetivo deste trabalho dar destaque ao problema da salinidade dos solos, estudando o comportamento da espécie *Brassica Napus* em condições de salinidade superiores às normais.

O trabalho consistiu assim no estudo dos efeitos provocados por metais tóxicos e por elevados teores de NaCl nas plantas de colza, submetendo-as à exposição a estes fatores através da contaminação da água de rega ao longo do ensaio. Para isso foram avaliados os efeitos visíveis da toxicidade dos três metais e do teor de NaCl nas componentes morfológicas como a biomassa total, a matéria seca das folhas e dos caules, assim como o teor de clorofila. Foram também determinados os teores de malondialdeído (MDA) e H_2O_2 , no sentido de averiguar a produção de Espécies Reativas de Oxigénio (ERO) e o seu efeito como consequência do stresse oxidativo normalmente induzido pela presença destes contaminantes. Foram ainda avaliados os teores em elementos minerais nas plantas para verificar não só a possibilidade de absorção e acumulação dos elementos tóxicos com vista a fitorremediação, como também para avaliar a interferência da contaminação na composição mineral naturalmente existente nas plantas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Elementos minerais nas plantas

Os elementos essenciais são frequentemente classificados como macronutrientes e micronutrientes de acordo com as suas concentrações nos tecidos das plantas. Definem-se como macronutrientes, os elementos minerais que, por exigência das plantas, apresentam concentrações superiores nos tecidos vegetais. Por sua vez os micronutrientes são aqueles que são essenciais à planta em quantidades menores. Por norma a concentração de macronutrientes é expressa em percentagem e a de micronutrientes em ppm, usualmente, em mg do elemento por kg de matéria seca. Por fim definem-se também os elementos benéficos que estimulam o crescimento e desenvolvimento de algumas plantas, não sendo essenciais para todas, como o exemplo do sódio.

No Quadro 1 apresentam-se os teores de macro e micronutrientes para as plantas em condições de crescimento normais.

Quadro 1 – Gamas de valores para o teor de nutrientes (macro e micro) nas plantas. Adaptado de Varennes, 2003.

Elemento essencial	Teor de elemento na planta (mg/kg de matéria seca)
Macronutriente	
Cálcio	2000 – 40000
Magnésio	1000 – 8000
Potássio	20000 – 50000
Micronutriente	
Manganês	20 – 500
Ferro	50 – 250
Zinco	25 – 150
Cobre	5 – 20

O macronutriente cálcio (Ca) é necessário ao normal funcionamento das membranas e marca a sua presença como recetor secundário em vários mecanismos de resposta da planta às condições ambientais (Sanders et al. 1999). O transporte de cálcio nas plantas dá-se no xilema, sendo um nutriente imóvel no floema. As forças motrizes do seu transporte são a transpiração e a pressão de raiz. A translocação do cálcio no xilema é inibida por níveis elevados de sais ou de ião amónio e pela falta de água, fatores que podem agravar a deficiência de cálcio na planta. Os sintomas característicos da deficiência em cálcio incluem necroses nas folhas e raízes mais jovens. Por vezes, ocorre também o crescimento lento da planta (Varennes, 2003).

No solo, o teor de magnésio (Mg) é normalmente superior ao do potássio, mas o magnésio é absorvido muito mais lentamente, o que resulta em teores mais baixos nas plantas (Varennnes, 2003). De acordo com Taiz & Zeiger (2006) o íon Mg^{2+} assume um papel específico na ativação de enzimas na respiração celular, na fotossíntese e na síntese de DNA e RNA. O magnésio é ainda um constituinte da clorofila. Uma das características associadas à deficiência de magnésio é a clorose entre as nervuras foliares ocorrer primeiro em folhas mais velhas, devido à mobilidade deste elemento. Acrescentando a este sintoma, pode ocorrer abscisão prematura das folhas.

O manganês, na forma iónica Mn^{2+} , é um ativador de enzimas. Em particular, as enzimas descarboxilase e desidrogenase envolvidas no ciclo de Krebs são ativadas pelo micronutriente manganês. Para além disso, o manganês desempenha um papel importante na reação de fotossíntese, pela produção de oxigénio a partir da molécula de água (Marschner, 1995). O magnésio e manganês são ambos ativadores de enzimas, podendo substituir-se mutuamente. Os sintomas resultantes da necessidade de manganês pelas plantas são a clorose associada ao desenvolvimento de pequenas manchas necróticas nas folhas.

O potássio é o catião (K^+) mais importante do ponto de vista quantitativo. A sua absorção é muito rápida e o íon é muito móvel nas plantas. O potássio intervém em várias etapas da fotossíntese, regula a abertura dos estomas necessária para a entrada do dióxido de carbono e permite o movimento das folhas para se orientarem em relação a luz (Varennnes, 2003). Este elemento desempenha funções ao nível da regulação do potencial osmótico das células e é um ativador de enzimas envolvidas na respiração celular e na fotossíntese. A deficiência em potássio revela sintomas ao nível foliar e dos caules, sendo os mais comuns necroses e cloroses junto das nervuras das folhas e enfraquecimento dos caules (Taiz & Zeiger, 2006).

Relativamente ao elemento sódio, as plantas diferem entre duas designações conforme a resposta ao íon sódio (Na^+). Plantas halófitas adaptadas a viver em ambientes salinos e plantas glicófitas com menor tolerância a este íon. As segundas podem ainda dividir-se em natrofóbicas e natrofílicas. Estas designações são importantes uma vez que o íon sódio difere as suas funções na planta consoante a tolerância das espécies vegetais. De acordo com Varennnes (2003), nas plantas natrofílicas o sódio é transcolado em maior quantidade e substitui o potássio em algumas das suas funções. Isto não acontece no caso das plantas natrofóbicas, nestas o sódio não toma o lugar do potássio nas funções de osmorregulação. O sódio acumula-se mais rapidamente que o potássio nos vacúolos, de que resulta a expansão celular mais precoce e a formação de maior área foliar quando a cultura ainda é jovem. Por esta razão a fotossíntese é mais intensa. A fixação de carbono pelas plantas C4 e CAM exige a presença de íões Na^+ (Taiz & Zeiger, 2006). O sódio pode ainda assumir um papel na

regulação do potencial osmótico substituindo o potássio. O sintoma mais frequente da deficiência de sódio são cloroses e necroses, à semelhança dos outros elementos minerais e ainda o possível atraso ou ausência na formação de flores.

De acordo com Varennes (2003) as plantas absorvem e transcolam o nutriente zinco (Zn) na forma iônica. Este elemento não altera o seu número de oxidação nem participa em reações de oxidação redução. O Zn é um elemento necessário à atividade de diversas enzimas. A deficiência em Zn nas plantas leva a uma diminuição da síntese proteica e desintegração dos ribossomas, uma vez que este micronutriente é um dos seus constituintes. Ao nível foliar, os sintomas revelam-se através da deformação das folhas. Nas folhas mais velhas podem aparecer sinais de clorose e o desenvolvimento de manchas necróticas. Este tipo de sintomas é o resultado da necessidade de zinco na biossíntese de clorofila.

Por fim, o elemento mineral ferro (Fe) é um mineral com funções ao nível enzimático e no transporte de eletrões, através de reações redox. A oxidação e redução das formas Fe^{2+} e Fe^{3+} tem lugar na transferência de eletrões. O sintoma relacionado com a deficiência em ferro é a clorose junto da nervura das folhas mais jovens. Em situações extremas de ausência de ferro nas folhas, as cloroses alastram-se em todo o tecido foliar, originando uma coloração amarela. A baixa mobilidade de ferro nas folhas maduras deve-se à precipitação deste elemento. Este fenómeno diminui consequentemente a mobilidade do metal no floema (Oh *et al.* 1996).

2.2. Metais pesados

A definição de um metal pesado é variável; Para os efeitos deste trabalho, será considerada a designação de metal pesado para os elementos com densidade igual a 5 g/cm^3 . Em particular, o arsénio é considerado um metaloide uma vez que o seu comportamento difere do comportamento de metais pesados (Duffus, 2002).

Uma designação mais abrangente é a de elementos potencialmente tóxicos (EPT), onde se incluem os elementos cobre, cádmio e arsénio.

O papel dos metais pesados no ambiente não se resume ao estado de contaminação dos ecossistemas. Muitos dos metais pesados são também micronutrientes, como é o caso do cobre. Para além disso, a presença de metais pesados em ambientes geoquímicos constitui um parâmetro que deve ser considerado no enquadramento destes elementos no meio natural.

A contaminação por metais pesados deve então ser encarada como uma situação onde o elemento atinge níveis de toxicidade superiores aos normais. Neste contexto de toxicidade

dos metais pesados, pode considerar-se o efeito tóxico provocado por metais pesados não essenciais que aparecem na natureza como poluentes, como sejam por exemplo, o Cd, Hg e Pb, mas também o efeito tóxico resultante da presença de certos metais pesados, como o Cu e Zn, que são essenciais para o normal desenvolvimento das plantas, mas que em concentrações elevadas podem causar toxicidade (Hall, 2002).

O excesso de metais pesados no solo constitui um problema ambiental na medida em que afeta a estabilidade dos ecossistemas, comprometendo assim a qualidade dos serviços por proporcionados.

2.2.1. Metais pesados e a contaminação dos solos

A atividade antrópica e fontes naturais encontram-se na origem da contaminação dos solos por metais pesados e elementos vestigiais.

Os metais pesados com origem em fontes naturais são libertados sobretudo pela meteorização das rochas. Este é um processo moroso, pelo que a sua contribuição para a contaminação dos solos se considera de baixo grau. No entanto, a atividade vulcânica com a sua elevada concentração em elementos vestigiais pode acrescentar às outras fontes naturais um elevado contributo para a contaminação dos solos.

As principais atividades antrópicas que contribuem para a contaminação dos solos são a extração de minério e de combustíveis fósseis, dos quais a sociedade se encontra muito dependente, seguindo-se a fabricação de automóveis e baterias e a produção de agroquímicos e fertilizantes essenciais associados à elevada produtividade agrícola (Varenes, 2003).

Na sua existência os metais pesados seguem um ciclo de transição nos vários ecossistemas. O grau de translocação destes elementos depende das suas propriedades, das características do meio, dos processos de pedogénese e da própria rocha-mãe.

A concentração de elementos vestigiais no solo varia com a natureza do próprio elemento podendo ser ou não atribuída a designação de solo contaminado (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores de concentração de alguns elementos vestigiais no solo e valores que indicam contaminação (Adaptado de Varennes, 2003).

Elemento	Concentração usual (mg/kg de solo)	Concentração em solos contaminados (mg/kg de solo)
As	< 5 a 40	até 25000
Cd	< 1 a 2	até 30
Cu	2 a 60	até 2000
Zn	25 a 200	10000 ou mais

2.2.2. Metais pesados, acumulação em plantas e toxicidade

A presença de metais pesados no solo é um ponto de partida para a absorção destes elementos pelas plantas. Contudo a absorção dos elementos pelas plantas depende em grande medida das diferentes propriedades do solo, como o pH, o teor de matéria orgânica, a capacidade de troca catiónica, os óxidos de ferro e manganês, a textura do solo e o teor de minerais de argila e a componente microbiana do solo, entre outras características (Varennes, 2003).

A biodisponibilidade de metais pesados para as plantas varia de espécie para espécie e depende da procura de metais específicos, que tenham comportamento de micronutrientes, e da capacidade da planta para regular a atividade do metal através da sua mobilização (Hirt *et al.*, 2004).

Os metais podem existir em diferentes formas químicas: solúveis na solução do solo (as únicas diretamente disponíveis para absorção pelas plantas), em formas precipitadas, em formas adsorvidas (ex. argila, matéria orgânica) ou em formas existentes na matriz dos minerais do solo (Reichman, 2002).

O conceito de toxicidade refere-se sobretudo à capacidade duma substância para perturbar o metabolismo normal de um organismo (Varennes, 2003). No entanto, a toxicidade revela-se um parâmetro de difícil análise, uma vez que se encontra dependente tanto da natureza do metal, como da forma tóxica existente, da biodisponibilidade, solubilidade, mobilidade nas plantas, entre outros fatores. Algumas plantas têm capacidade de desenvolver mecanismos específicos para regular a biodisponibilidade dos metais através de mecanismos externos que atuam na restrição da absorção do metal a partir do solo. Outras plantas podem conter elevadas quantidades intracelulares de um metal específico, que para outros organismos é tóxico (Clemens, Palmgren, & Krämer, 2002), sendo designadas por plantas acumuladoras ou hiperacumuladoras (Ent *et al.*, 2013).

Para os metais essenciais a curva dose/resposta apresenta fases de deficiência, crescimento ótimo e toxicidade, por outro lado, para os metais não-essenciais, a fase de deficiência não existe, e apenas ocorrem as fases de tolerância e toxicidade para as concentrações mais elevadas (Ent *et al.*, 2013).

A absorção de metais pelas plantas passa por diferentes níveis de tolerância destes organismos. Consideram-se tolerantes as plantas que, suportam níveis de toxicidade que para outras espécies seriam nocivas.

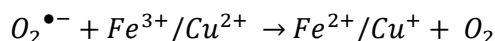
A capacidade de acumulação de metais pelas plantas pode torna-las capazes de participar em processos designados por fitorremediação, ou seja, a remediação do solo por ação das plantas. Este processo baseia-se na capacidade das plantas crescerem num solo com concentrações significativas desses metais retirando-os assim dos solos. Estes processos serão abordados posteriormente.

2.2.3. Iões metálicos e metabolismo secundário

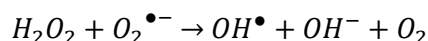
Um dos sintomas mais frequentes da exposição das plantas a iões metálicos é a acumulação de ERO. Esta acumulação é resultado da perturbação, pelos iões metálicos, do estado normal do metabolismo dos radicais livres. Na presença de metais de transição, como o Cu^+ e o Fe^{2+} , o H_2O_2 é convertido em radicais hidroxilo (OH^\bullet) altamente reativos desencadeando uma série de reações catalisadas pelo metal – via reação de Fenton. Posteriormente, os iões metálicos oxidados sofrem uma nova redução, numa reação com os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Uma outra via de produção de radicais hidroxilo, diretamente de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, designa-se por reação de Haber-Weiss e caracteriza-se por ser independente da presença do metal (Mithofer *et al.*, 2004). Ambas as reações traduzem-se pelas seguintes equações:

Reações de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Tanto o cádmio como o arsénio não participam diretamente nas reações acima descritas pelo que a produção de ERO não se relaciona com este mecanismo. Uma possível explicação para a produção de ERO em plantas submetidas a stresse por estes elementos poderá ser o facto

de o Cd^{2+} inibir a atividade antioxidante das enzimas e consequentemente dar-se a acumulação natural de ERO (Mithofer *et al.*, 2004). Uma outra hipótese baseia-se na substituição do Fe por Cd em compostos celulares. Isto torna o Fe disponível para participar nas reações de Fenton conduzindo assim a uma produção de ERO. O metal cobre participa diretamente em ambas as reações, pelo que a produção de ERO é facilmente entendida.

No caso do arsénio, o mecanismo de produção de ERO não é totalmente conhecido. No entanto, vários estudos apontam que a redução do arsénio V para arsénio III, assim como a indução da síntese de fitoquelatinas (PC) assumem um papel influente na produção de ERO (Finnegan and Chen, 2012).

2.2.4. Arsénio: Origem e comportamento nas plantas

O arsénio apresenta uma densidade de $5,5 \text{ g/cm}^3$ e é considerado um metaloide. É um metal do grupo 15 e pertence ao quarto período da tabela periódica. Este elemento apresenta quatro estados de oxidação sendo eles As^{3-} , As^0 , As^{3+} e As^{5+} , sendo o arsenito, As^{3-} , também representado por As (III) e o arsenato, As^{5+} , também representado por As(V). As formas reduzidas ou metiladas são facilmente voláteis pelo que não ficam retidas no solo em quantidades consideradas relevantes, no que respeita a toxicidade.

O arsénio pode ter dois tipos de origem, natural ou antropogénica, consideram-se dois tipos de emissão para o meio que são (a) por processos naturais e (b) por processos industriais. Os processos naturais de libertação de arsénio são a meteorização e a atividade vulcânica que podem transportar partículas suspensas através da água e do ar. As atividades industriais constituem principal fonte de emissão de arsénio e contribuem para a maior percentagem de contaminação por este elemento (Sarkar, 2002). A indústria do vidro, dos pigmentos e de semicondutores são exemplos de grandes emissores de arsénio.

Uma vez que o comportamento do arsénio no solo está dependente do seu estado de oxidação, a sua distribuição vertical no solo varia fortemente. Em solos com elevado teor de argila, o arsénio acumula-se apenas no primeiro horizonte de solo e é facilmente lixiviado para as camadas inferiores com alto potencial de redução. A presença de arsénio no solo é, em termos de mobilidade para as plantas, reduzida, apenas uma pequena fração do arsénio total, se encontra disponível para as plantas (Kabata-Pendias, 2011).

Os sintomas que revelam toxicidade por arsénio são frequentemente mudança na coloração das folhas (cor arroxeada que indica um aumento de antocianinas), a descoloração das raízes e a plasmólise das células. No entanto, o sintoma mais frequente é a redução acentuada do crescimento das plantas. Apesar de todos estes sintomas, muitas plantas são conhecidas pela

sua tolerância à presença de arsénio nos solos, tornando-se espécies com bom comportamento em tratamentos de remediação dos solos (Kabata-Pendias, 2011).

A remediação do solo contaminado por arsénio envolve processos complexos, que abrangem um leque de técnicas como a fixação química, a biorremediação, a remoção eletrocinética e a fitorremediação, que terá particular destaque neste trabalho.

2.2.5. Cádmio: Origem e comportamento nas plantas

O cádmio, metal de transição pertencente ao grupo 12, apresenta uma densidade de 8,6 g/cm³ entrando assim na definição de metal pesado (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Embora o cádmio só tenha começado a ser utilizado no século XX, a contaminação dos solos iniciou-se muito mais cedo, por o elemento estar associado a minérios de zinco, cobre e chumbo. Cerca de 85% da contaminação ambiental com cádmio provém de emissões antrópicas devido à extração e uso destes minérios, uso de combustíveis fósseis, e incineração de lixos urbanos e industriais (Varennnes, 2003).

As práticas agrícolas constituem também uma percentagem das causas da poluição por cádmio com origem antrópica, sendo a aplicação de fertilizantes e pesticidas as práticas mais prejudiciais (Nagajyoti *et al.*, 2010).

A mobilidade de cádmio no solo diminui com o aumento do pH, o teor de matéria orgânica e da quantidade de colóides capazes de o adsorver. A sua disponibilidade é ainda baixa em solos alagados, por se formar sulfureto de cádmio (CdS). Pelo contrário, as plantas absorvem mais cádmio em solos ácidos e em solos salinos, devido à formação de complexos solúveis com o ião cloreto (como CdCl⁻) (Varennnes, 2003).

A concentração média de cádmio nos solos apresenta valores próximos de 0,41 mg/kg. Em solos não contaminados, a concentração de cádmio varia de acordo com a textura do solo e apresenta-se em quantidades entre 0,01 e 0,3 mg/kg em solos arenosos e entre 0,2 e 0,8 mg/kg em solos argilosos. Aparentemente, todos os valores superiores aos padrão refletem um impacto negativo da atividade antropogénica nos solos e no seu teor em cádmio (Kabata-Pendias, 2011).

O cádmio é um elemento não essencial, que provoca efeitos nefastos no metabolismo das plantas. Este elemento é absorvido tanto ao nível de raízes como da parte aérea da planta. A absorção ao nível foliar deve-se sobretudo à poluição atmosférica por emissões industriais e urbanas. Pode ainda ocorrer por deposição à superfície da planta, mas neste caso o cádmio permanece fora dos tecidos (Kabata-Pendias, 2011).

Ao nível de absorção pelas raízes das plantas, apenas uma pequena fração do cádmio total presente no solo se encontra disponível para as plantas. A biodisponibilidade do cádmio depende fortemente de fatores como o pH e o teor de matéria orgânica. Algumas plantas são capazes de crescer em ambientes contaminados, evitando a absorção e acumulação deste metal nas suas raízes e caules (Martin *et al.*, 2012), através de estratégias de exclusão.

A mobilidade do cádmio no solo dá-se através da forma Cd^{2+} . Contudo a mobilidade deste elemento no solo está dependente do elevado grau de competição com os iões Ca^{2+} e K^{+} à superfície dos colóides de argila e orgânicos. Tanto a disponibilidade de nutrientes como o pH, fator já referido, interferem na biodisponibilidade do cádmio e na absorção deste elemento pelas plantas (Santos, 1991; Gomes, 1998; Pinto, 2011).

A tolerância das plantas ao cádmio pode constituir um problema uma vez que plantas tolerantes poderão não evidenciar sinais de contaminação. Muitas destas plantas fazem parte da dieta humana, pelo que os riscos de toxicidade para a saúde humana podem ser elevados.

Os efeitos do cádmio na planta podem ser visíveis ao nível da produção de clorofila na parte foliar da planta, uma vez que este elemento provoca inibição da atividade fotossintética. Assim, alguns sintomas de fitotoxicidade das plantas são o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas, seguidas pela abscisão foliar. Vários autores demonstraram ainda que a absorção de Cd pelas plantas pode levar a inibição do seu crescimento ou mesmo causar a morte (Sandalo *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007).

De acordo com Maksymiec & Krupa (2006), uma concentração de 100 μM de cádmio nas plantas acelera a produção de ERO, como o H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este elemento não participa diretamente nas reações de Fenton ou Haber-Weiss para produção de ERO, no entanto induz a sua produção, de forma indireta. Além disso, interfere em diversas funções celulares formando complexos com grupos laterais de compostos orgânicos como, proteínas, lípidos e nucleótidos, conduzindo assim à inibição da expressão genética e atividades enzimáticas (di Toppi & Gabbrielli, 1999; Pinto, 2011).

2.2.6. Cobre: Origem e comportamento nas plantas

O elemento cobre é um metal pesado com características distintas dos referidos acima por ser um micronutriente essencial para as plantas. Este elemento do grupo 11 pertencente ao quarto período da tabela periódica, apresenta quatro estados de oxidação, Cu^{+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} e Cu^{4+} , sendo os dois primeiros os mais comuns.

A atividade antrópica é, mais uma vez, a causa principal da contaminação de solos por este metal, nomeadamente através das atividades agrícola e industrial. O uso continuado de

fungicidas com cobre, a aplicação de efluentes de pecuária no solo, assim como de lamas de tratamento de águas residuais são as principais causas da poluição atmosférica por cobre (Varennnes, 2003).

O teor de cobre nos solos varia usualmente entre 1 a 60 mg Cu/kg de solo, mas pode ser muito superior em solos contaminados com o metal. A retenção e disponibilidade de cobre nos solos depende da textura, teor de matéria orgânica, reação, teor de carbonatos, teor de óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganésio. O cobre encontra-se na estrutura de vários minerais, onde, através de substituições isomorfas, ocupa o lugar do manganês, do ferro e do magnésio (Varennnes, 2003).

A disponibilidade de cobre para as plantas varia consoante as características acima referidas, por exemplo, um solo de textura fina com uma capacidade de troca catiónica elevada terá uma maior percentagem de cobre disponível para as plantas, em comparação com solos de textura mais grosseira.

O cobre é um micronutriente essencial necessário ao crescimento e desenvolvimento das plantas. É um elemento estrutural de várias proteínas e integra o sistema de transporte de eletrões na fotossíntese, a respiração mitocondrial, o metabolismo das paredes celulares, entre outros processos na planta. O excesso de cobre tem contudo algumas desvantagens e em determinadas quantidades torna-se um metal tóxico causando a inibição do crescimento, a descoloração das folhas, cloroses e necroses. Para além disso, o excesso de cobre induz também a deficiência em nutrientes a par dos processos de transporte celular e da perturbação do estado redox homeostático das células. As reações de oxidação-redução entre os dois estados de oxidação do cobre (Cu^+ e Cu^{2+}), que têm elevada afinidade para moléculas orgânicas, catalisam a formação de diferentes ERO, o que danifica as macromoléculas (Feigl *et al.*, 2013; Clemens, 2002). O excesso de cobre causa assim a destruição de membranas e induz a deficiência de ferro, uma vez que o substitui em várias proteínas.

De acordo com Marschner (1995), para teores de cobre superiores a 20 a 30 mg/kg de matéria seca podem ser observados sintomas de toxicidade.

A capacidade de alterar o seu estado redox confere a este elemento a capacidade de provocar stresse oxidativo direto. Os iões do primeiro estado de oxidação Cu^+ reagem segundo as reações de Fenton, com o H_2O_2 formando radicais hidroxilo (OH^\bullet) (Marschner, 1995, Baptista 2009). Por sua vez o estado de oxidação Cu^{2+} reage com o radical O_2^\bullet , numa reação Haber-Weiss, reduzindo o seu estado de oxidação para Cu^+ o que leva a nova reação com o H_2O_2 .

2.3. Stresse Oxidativo

Quando as plantas são submetidas a situações de stresse como a elevada intensidade de luz, temperaturas elevadas, stresse hídrico, elevada salinidade, deficiência ao nível de nutrientes e a presença de iões metálicos, o balanço entre a produção de ERO e o nível de atividade dos antioxidantes aumenta, causando danos oxidativos e alterações na fisiologia da planta (Ahmad *et al.*, 2008). Esse aumento desencadeia na planta uma resposta metabólica, que se traduz na ativação de mecanismos específicos de eliminação do excesso de ERO no interior das células de forma a obter um controlo da sua acumulação, bem como a regulação da expressão genética para a produção de metabolitos como o H_2O_2 , glutathione reduzida e oxidada, ascorbato e desidroascorbato (Mourato *et al.*, 2012).

Define-se assim, stresse oxidativo como o conjunto de alterações fisiológicas, resultantes da ação direta ou indireta de ERO (Van Gronsveld *et al.*, 1994).

As células sujeitas a stresse oxidativo geram varias disfunções como lesões causadas por ERO nos lípidos, proteínas e no DNA. (Ercal *et al.*, 2001).

Os fatores abióticos constituem assim, fontes de stresse oxidativo, causando um desequilíbrio nos teores de ERO intracelulares e consequentemente danos de natureza oxidativa que afetam o desenvolvimento das plantas.

2.3.1. Produção de ERO

As espécies reativas de oxigénio têm na sua origem o oxigénio atmosférico (O_2) que é reduzido formando subprodutos como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), os radicais hidroxilo (OH^{\bullet}) e o singlete de oxigénio (1O_2) (Baptista, 2009; Pinto, 2011).

Em relação à estabilidade das ERO, consideram-se o peróxido de hidrogénio e o radical superóxido as espécies menos reativas que se formam em situações de ausência de stresse, ou seja, compõem o normal metabolismo das plantas. Por outro lado, o radical hidroxilo e o singlete de oxigénio formam-se apenas em situações de stresse oxidativo e apresentam uma reatividade elevada. Em particular o radical hidroxilo, com um curto tempo de semivida, é difícil de eliminar uma vez que, não são ainda conhecidas as moléculas específicas encarregues da sua degradação, tornando-se mais vantajoso eliminar a origem do problema, como o radical superóxido. Assim, as células desenvolvem mecanismos que mantêm as concentrações de superóxido e peróxido de hidrogénio sob elevado grau de controlo (Apel *et al.*, 2004).

Nas plantas, as ERO são produzidas constantemente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxisomas, organelos com elevada atividade metabólica e com elevada taxa de transportes

de elétrons (Baptista, 2009). A formação de ERO nestes organelos ocorre na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias, nos fotossistemas I e II, nos cloroplastos e reações de fotorrespiração nos peroxisomas.

A peroxidação das membranas dos lípidos ocorre quando as ERO reagem com ácidos gordos insaturados levando à danificação dos compartimentos celulares e possível morte celular. O efeito mais indesejável deve-se sobretudo à sua capacidade de iniciar uma cadeia de reações com efeito de auto oxidação dos ácidos gordos insaturados. O ataque oxidativo nas proteínas resulta numa modificação dos aminoácidos, fragmentação da cadeia peptídica e aumento da suscetibilidade à proteólise (Ahmad *et al.*, 2008).

Os danos oxidativos provocados pelas ERO levam à inibição de determinadas vias metabólicas por inibição de enzimas específicas (como por exemplo fotossíntese e ciclo de Calvin), alterações nas membranas dos cloroplastos, nos teores de clorofila total e na capacidade fotossintética. A destabilização de membranas e o aumento da permeabilidade a iões e solutos é também um efeito nocivo das ERO (Mourato *et al.*, 2012).

2.3.2. Mecanismos de defesa das plantas

Os organismos estão metabolicamente preparados para eliminar quantidades controladas das espécies reativas de oxigénio, mas em condições de stresse há aumento da produção intracelular de ERO, pelo que os mecanismos normais de defesa não são suficientes para os eliminar e dessa forma anular o seu efeito adverso.

Várias espécies reativas de oxigénio são continuamente produzidas em plantas como produtos resultantes do metabolismo aeróbio. Dependendo da natureza das ERO, estas podem ser consideradas tóxicas e rapidamente serem transformadas por vários mecanismos celulares enzimáticos ou não-enzimáticos. Enquanto as plantas estabelecem a necessidade de combater os níveis elevados de ERO durante um stresse abiótico, em outras circunstâncias as plantas podem produzir propositadamente ERO como um sinal de controlo de vários processos, como a defesa contra patogénicos ou a morte celular programada (Ahmad *et al.*, 2008).

A resposta das plantas ao stresse oxidativo provocado pelo excesso de ERO é caracterizada por um conjunto de alterações fisiológicas e metabólicas, que consiste no desenvolvimento de um conjunto de estratégias de resposta ao stresse. Plantas com um elevado nível de antioxidantes têm sido reportadas como tendo elevada resistência aos danos oxidativos. A capacidade dos tecidos de plantas para mobilizarem defesas enzimáticas contra a peroxidação lipídica, constitui um fator importante na definição de plantas tolerantes ou intolerantes a determinada situação de stresse.

2.4. A salinidade e o sistema solo-planta

A degradação do solo constitui um dos problemas mais graves a nível ambiental. Um solo degradado acarreta inúmeras preocupações ao nível ambiental, económico e social.

A FAO (1978) definiu degradação do solo como a diminuição da sua capacidade e potencial de produção, tanto em quantidade como em qualidade, de bens e serviços, como resultado de um ou mais processos de degradação. De acordo com Fageria, *et al.*, 2011, a degradação do solo consiste na deterioração das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, resultado de perturbações no ambiente, limitando a sua capacidade produtiva.

A salinidade de um solo, com especial destaque neste trabalho, constitui um problema associado à degradação de propriedades químicas do solo, a par com a deficiência de nutrientes, a acidez do solo, e o uso indiscriminado de pesticidas e fertilizantes agrícolas.

O excesso de sais no solo é um dos problemas que mais afeta a produtividade das culturas a nível mundial (Ashraf, *et al.*, 2005). Estima-se que cerca de 20% das áreas cultivadas e 33% da agricultura de irrigação têm problemas de salinidade do solo (Fageria, *et al.*, 2011).

Os solos afetados pela excessiva concentração de sais são mais comuns em regiões de clima árido e semi-árido. No entanto, com o passar dos anos a restrição a áreas com características de deserto não tem sido regra. Os solos mais salinos podem também encontrar-se em zonas mais húmidas e é frequente a sua associação com áreas próximas do mar (Fageria, *et al.*, 2011; Shanker, *et al.*, 2011).

Uma das maiores preocupações em torno da salinidade dos solos é a lixiviação destes sais para águas subterrâneas e, no caso de climas áridos, a acumulação de sais nos horizontes superficiais, causa que impede o normal crescimento de plantas.

O teor elevado de sais no solo tem a sua origem principalmente em fertilizantes, corretivos agrícolas e na água de rega. Em particular o processo de salinização do solo é acelerado pela rega inadequada de culturas. A gestão da rega e a qualidade da água, inerentes a cada cultura, são fatores que devem ser estritamente controlados, de modo a prevenir e evitar a degradação do solo. Das várias fontes de salinidade do solo, a irrigação combinada com a fraca drenagem do solo são as que mais contribuem para esta problemática (Shanker, *et al.*, 2011). Em Portugal, a salinidade dos solos tem também origem na intrusão de águas marinhas.

O sódio constitui um elemento benéfico ao crescimento das plantas (Varennnes, 2003). Contudo, o excesso sais no solo provoca a deficiência de nutrientes, por diminuição da absorção de nutrientes como o fósforo, o potássio, nitratos e cálcio, constituindo um detrimento ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Hirt, *et al.*, 2004), representado na Figura 1.

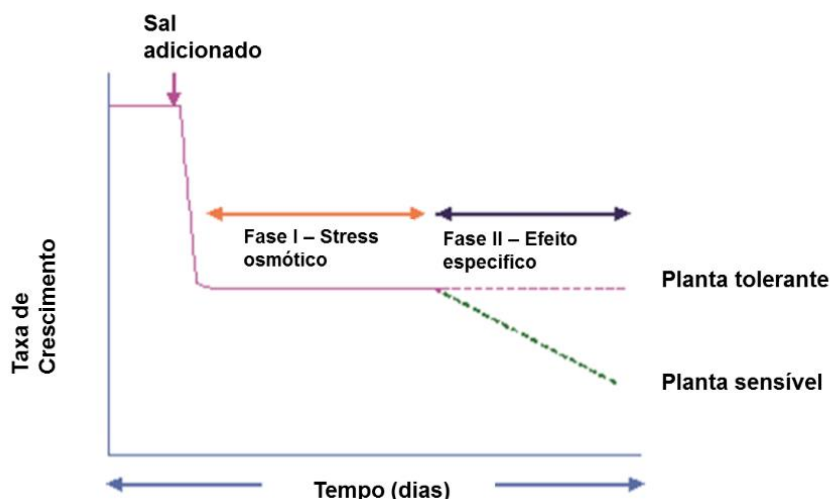


Figura 1 - Esquema de resposta à salinidade em duas fases de crescimento (Adaptado de Fageria *et al.*, 2011.)

A presença de minerais como o cálcio, magnésio e o sódio na água de rega é fundamental para a produtividade das culturas. No entanto, deve ser tida em conta a dinâmica dos iões correspondentes, Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ , no solo. Com a evaporação da água do solo, a formação de carbonatos por precipitação dos iões de cálcio e magnésio, leva à presença dominante do ião de sódio (Na^+). A presença em excesso deste ião inicia o potencial osmótico da planta e evita a entrada de sais na raiz. O efeito da salinidade do solo é semelhante à seca. A inibição de entrada de água na raiz da planta provoca stresse hídrico, o que leva à ativação dos mecanismos de defesa da planta em situações de stresse oxidativo. O excesso de iões de Na^+ e Cl^- conduz, também, à alteração da estrutura das proteínas e à mudança do potencial elétrico da membrana plasmática das células, provocando a sua despolarização. A perda de volume celular devida ao stresse osmótico é também um efeito negativo provocado pelo excesso de sais no solo (Shanker, *et al.*, 2011).

Em relação às plantas, a elevada salinidade na rizosfera afeta a exsudação das raízes e a decomposição da matéria orgânica pelos microrganismos do solo. De acordo com Li, *et al.* (2006), verifica-se uma correlação negativa entre a condutividade elétrica do solo, provocada pela presença de sais, e a emissão total de dióxido de carbono (CO_2) ou a biomassa microbiana de carbono, observando-se assim um efeito adverso na atividade microbiana do solo. Para além disso, o stresse osmótico já descrito, constitui um impacto negativo no sistema fisiológico da planta.

Apesar dos efeitos que o teor elevado de sais no solo condiciona às plantas e ao seu desenvolvimento, o comportamento e capacidade de resistência destes seres-vivos a condições de elevada salinidade difere de espécie para espécie. Assim, em relação a este fator, são considerados quatro grupos distintos de plantas: tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensíveis e sensíveis (Quadro 3).

Quadro 3 - Tolerância Relativa de Culturas à Salinidade (Adaptado de Fageria *et al.*, 2011).

Tolerante	Moderadamente tolerante	Moderadamente Sensível	Sensível
Cevada	Sorgo	Milho	Arroz
Colza	Trigo	Cana-de-açúcar	Sésamo
Triticale	Soja	Pepino	Cenoura
Aveia	Girassol	Batata	Cebola
Centeio		Tomate	Feijão

2.5. Solos contaminados e Fitorremediação

A contaminação dos solos, consequência da atividade humana, é uma preocupação global, particularmente nos casos em que os solos estão próximos de minas e de indústrias metalúrgicas. Como consequência, a poluição de águas subterrâneas e a contaminação de produtos agrícolas são efeitos deste fenómeno (Ghnaya, *et al.*, 2009).

Doenças potencialmente fatais podem desenvolver-se por acumulação excessiva de metais pesados no organismo humano. Existem assim diversas estratégias para remediação de solos poluídos que têm sido desenvolvidas para minimizar a probabilidade de contaminação na cadeia alimentar (Wang, *et al.*, 2002).

No compartimento solo, os metais tendem a ligar-se a compostos argilosos, acumulando-se nas camadas superficiais do solo. Todavia, em processos de lixiviação estes compostos atingem as águas subterrâneas o que constitui um perigo para a saúde pública, uma vez que esta água pode ter vários destinos como a rega, abastecimento doméstico ou industrial.

A legislação portuguesa para a concentração de metais pesados, em particular o As, Cd e Cu, em águas de rega e no solo, estabelece-se por via dos Decretos-Lei nº 236/98 e nº 276/2009, respetivamente. O Quadro 4 resume esses limites com base no VMA (valor máximo admissível) e no LM (limite máximo).

Quadro 4 - Limites de metais tóxicos admissíveis de acordo com a legislação em vigor

Teor de Cádmio	
Águas de Rega	VMA: 0,05 mg/L
Solos	LM: 1 mg/kg MS ($\text{pH} \leq 5,5$)
	LM: 3 mg/kg MS ($5,5 < \text{pH} \leq 7$)
	LM: 4 mg/kg MS ($\text{pH} > 7$)
Teor de Cobre	
Águas de Rega	VMA: 5 mg/L
Solos	LM: 50 mg/kg MS ($\text{pH} \leq 5,5$)
	LM: 100 mg/kg MS ($5,5 < \text{pH} \leq 7$)
	LM: 200 mg/kg MS ($\text{pH} > 7$)
Teor de Arsénio	
Águas de Rega	VMA: 10 mg/L

A remediação dos solos envolve métodos e processos usados para tratar os contaminantes presentes no solo de modo a contê-los, removê-los, degradá-los ou torná-los menos prejudiciais. A remediação *in situ* engloba os tratamentos efetuados ao solo no próprio local, enquanto a remediação *ex situ* envolve a remoção física do solo e tratamento noutra local (Varenes, 2003).

Com particular destaque para a remediação *in situ*, esta envolve processos como a fitorremediação que tem especial importância no âmbito desta dissertação. Existem também processos como a volatilização, remoção eletrocinética e adição de corretivos, que são normalmente usados para descontaminação do solo quando estão em causa compostos inorgânicos, como o caso dos metais pesados.

A fitorremediação baseia-se na capacidade das plantas para crescerem em ambientes mais hostis, como solos contaminados por metais pesados. A extração dos minerais essenciais para o desenvolvimento das plantas, associa-se também à extração dos metais pesados do solo. De facto, algumas plantas são conhecidas pelas suas capacidades de tolerância e acumulação de metais, concentrando-os nas raízes e fazendo a sua translocação para a parte aérea das plantas. As plantas hiperacumuladoras caracterizam-se por conseguirem acumular nas suas raízes cerca de 10 a 500 vezes mais metais nos caules e folhas que as espécies normais (Ghnaya *et al.*, 2009).

Salt *et al.*, (1998) definiu fitorremediação como o uso de plantas para remover poluentes do meio ambiente ou torná-los inócuos. Por sua vez, McGrath *et al.*, (2002) definiu o processo de fitorremediação como o uso de plantas para melhorar o ambiente (Fageria *et al.*, 2011).

Existem três grupos de plantas: plantas-padrão (1), plantas acumuladoras (2) e plantas de rejeição (3) (Fageria *et al.*, 2011). Nas plantas-padrão a relação entre a absorção do metal e a sua concentração no solo é linear. No caso das plantas acumuladoras, a absorção dos metais pesados é elevada quando a concentração de metais no solo é baixa, e inferior quando a acumulação de metais na planta é elevada. Em contraste, as plantas de rejeição absorvem pequenas quantidades de metal até um nível crítico de concentração do metal no solo, a partir deste limite a absorção pela planta aumenta exponencialmente com o aumento da concentração de metal no solo. Estes comportamentos são ilustrados na Figura 2.

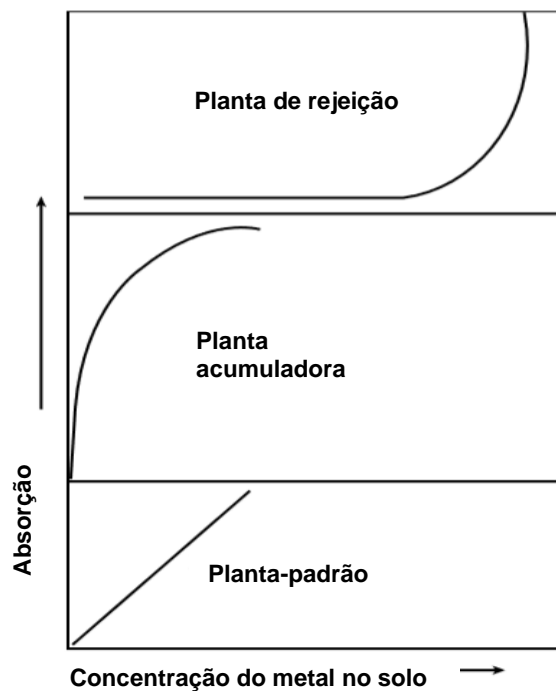


Figura 2 - Absorção de metal por três grupos diferentes de plantas (Adaptado de Fageria *et al.*, 2011).

O processo de fitorremediação engloba dois processos: a fitoestabilização e a fitoextração (Varennnes, 2003). A fitoestabilização consiste no processo de libertação de oxigénio e outros compostos para o solo com o objetivo de imobilizar os metais contaminantes. Mais concretamente em locais contaminados por metais pesados, recorre-se a uma cobertura vegetal adequada prevenindo a perda de solo por erosão. Esta cobertura tem também a função de estabilizar a situação do solo contaminado. Com a introdução de cobertura vegetal, as suas raízes absorvem águas de lixiviação prevenindo a contaminação de horizontes mais profundos do solo, e possivelmente de águas subterrâneas. Este é um processo que pretende assegurar que a situação de contaminação não atinge maiores dimensões e tem tido sucesso em ambientes de minas e de antigas indústrias metalúrgicas. Por sua vez, a fitoextração consiste na absorção de metais pesados pelos tecidos vegetais. Neste caso de remediação *in situ*, devem ser utilizadas plantas com elevada produção de biomassa e de crescimento rápido. De acordo com Pilon-Smith (2005) o material vegetal pode ser colhido e

posteriormente usado para outros fins ou incinerado. As cinzas podem ser usadas para recuperar os elementos extraídos.

Acrescentando aos métodos descritos, a fitoadsorção e rizorremediação são também alternativas de tratamento de solos por fitorremediação. O primeiro pressupõe a imobilização dos metais através do processo de adsorção dos metais pelo sistema solo-raiz. A rizorremediação prevê a estimulação da biorremediação por fungos ou outros microrganismos localizados no sistema radicular das plantas.

A fitorremediação tem vindo a ganhar importância nos últimos 10 anos, na medida em que apresenta um custo-eficácia favorável e representa uma alternativa não invasiva e complementar às tecnologias normais de remediação de solos. As plantas podem assim ser usadas para estabilização, extração, degradação e volatilização de poluentes presentes nos compartimentos solo, ar e água (Pilon-Smith, 2005).

A fitorremediação tem como principais vantagens o impacto positivo na paisagem aliado aos baixos custos de implementação e manutenção, a sua elevada eficiência em áreas contaminadas de grande dimensão, a redução de lixiviados e escoamentos superficiais diminuindo a erosão do solo e a possibilidade de valorização do produto final, através da reciclagem dos metais extraídos ou da produção de energia através da queima do material vegetal. As desvantagens deste processo residem principalmente ao nível da contaminação na cadeia alimentar. A seleção das plantas quanto ao metal presente no solo pode ser um fator restritivo do processo de fitorremediação e no caso da concentração de metais no solo ser muito elevada, a vegetação pode não se desenvolver conduzindo à estagnação do processo.

As propriedades do solo, o nível de toxicidade e o clima condicionam o processo de fitorremediação, na medida em que estão diretamente relacionados com o crescimento e desenvolvimento da planta. A profundidade das raízes é um fator que afeta a capacidade das plantas no processo de remediação do solo, uma vez que estas podem não conseguir atingir os níveis em que se encontra o poluente. Por outro lado, os processos biológicos envolvidos podem retardar a fitorremediação do compartimento a remediar. A biodisponibilidade dos poluentes limita também o processo uma vez que, não estando disponíveis para as plantas, a fitorremediação não é aplicável. A biodisponibilidade dos poluentes depende essencialmente das suas propriedades químicas, das propriedades do solo e das condições ambientais (Pilon-Smith, 2005).

O sucesso da fitorremediação está então dependente da evolução constante de métodos e técnicas que permitam aferir às espécies hiperacumuladoras mais eficiência de remoção. A

otimização de práticas agrícolas como a irrigação e fertilização pode contribuir para o aumento da produtividade e eficiência de remoção das plantas acumuladoras. O cruzamento com espécies com maior produção de biomassa pode originar espécies mais vantajosas em tratamentos de remediação dos solos. A análise dos vários mecanismos desenvolvidos pelas plantas deve ser alvo de estudo profundo, promovendo uma maior tolerância destas plantas aos metais pesados.

A fitorremediação é muitas vezes considerada a tecnologia mais viável, em termos económicos e ambientais, para a remediação de solos com metais pesados (Fageria *et al.*, 2011).

Uma outra abordagem de prevenção da contaminação da cadeia alimentar, pode cingir-se à seleção prévia das culturas e práticas agrícolas implementadas em solos contaminados. Torna-se assim essencial a investigação ao nível da sensibilidade e respostas de diferentes culturas a elevadas concentrações de metais pesados (Wang, *et al.*, 2002).

2.6. A cultura da colza

A colza enquadra-se no grupo das culturas oleaginosas, sendo os seus principais fins a produção de forragem para alimentação animal e a produção de biodiesel. Na agricultura a introdução da cultura de colza permite o enriquecimento de solos em períodos de pousio de outras culturas, assumindo assim um papel de cultura reabilitadora de solos, preparando-os para culturas mais exigentes. Ao nível ambiental, a produção de biocombustíveis integra-se nas energias renováveis, com produção de óleo para biodiesel. De acordo com El Bassam (1998) as sementes de colza são ricas em óleo, atingindo uma produção que varia entre 2 e 3,5 t/ha com uma percentagem de óleo de 40 a 50%, o que equivale a uma produção de óleo de cerca de 1,26 t/ha.

A colza (Figura 3), *Brassica napus* L., é uma cultura anual C3 com origem no Mediterrâneo e distribuição nos países Europeus, Canadá, Austrália e no oeste Asiático. Pertence à família *Brassicaceae* e tem variedades de inverno e de primavera.

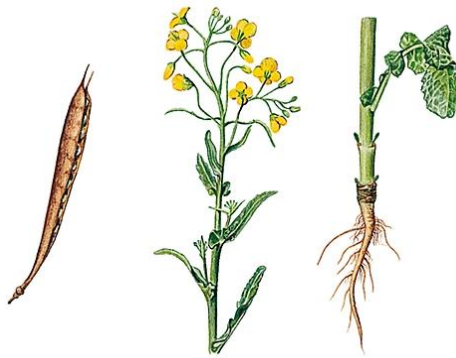


Figura 3 - Ilustração de *Brassica napus* L.: vagem com sementes (esquerda), ramo com folhas e inflorescências (centro); caule e raiz (direita). (Adaptado de Larousse, 2013)

A planta de colza apresenta uma rápida germinação (El Bassam, 1998) e é composta por um sistema radicular aprumado e denso, com facilidade em desenvolver raízes secundárias. Os caules, com elevada dureza e densidade, podem atingir entre 0,5 e 1,7 m de altura. As folhas inferiores são pecioladas e à medida que crescem, apresentam um limbo bem definido que acompanha a forma lobulada e alongada das folhas. As folhas apresentam uma cor que oscila entre o verde-claro e escuro, de acordo com as condições ambientais de desenvolvimento e com o grau de crescimento. As flores amarelas, agrupadas na extremidade do caule em cada uma das ramificações, são hermafroditas com quatro pétalas dispostas em forma de cruz. Os frutos desta planta nascem em forma de vagem alongada com cerca de 5 cm de comprimento. No interior das vagens encontram-se sementes em número elevado, que apresentam uma coloração castanha quando maduras. As diferentes fases de desenvolvimento representam-se na Figura 4.

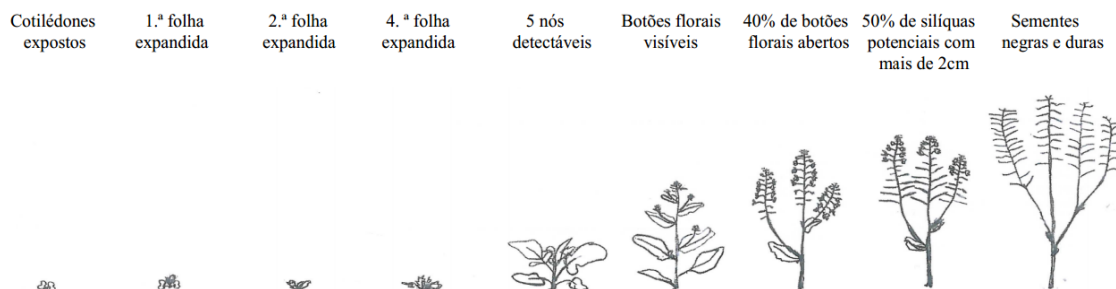


Figura 4 - Ilustração das fases de desenvolvimento da colza (Adaptado de Ferreira, 2009).

A colza é uma espécie de clima temperado, cuja temperatura do solo condiciona a germinação de sementes. Desta forma o solo condiciona o desenvolvimento da planta constituindo um fator limitante nesta cultura. Considera-se a colza uma cultura resistente à salinidade nos solos e as suas necessidades de água aumentam com a idade, atingindo valores superiores na fase de floração (Ferreira, 2009).

Atualmente, um grande interesse tem sido endereçado à potencialidade das plantas na recuperação de solos contaminados com metais pesados. De acordo com Rossi *et al.*, (2002), a fitorremediação de solos com culturas com fins não alimentares tem sido um parâmetro analisado para o controlo de metais pesados em solos aráveis. Os critérios, já referidos, para a seleção de culturas para fitorremediação, como a tolerância aos metais pesados, a elevada biomassa e o crescimento acelerado das plantas, incluem a espécie *Brassica napus* no grupo de plantas com potencial de remediação do solo. Os estudos de avaliação de *Brassica napus* e da sua capacidade para remediar os solos têm vindo a ganhar importância dada a adaptação elevada e a resistência desta cultura a situações adversas. Recentemente, Witters *et al.*, (2012) afirmou que o uso integrado de fitorremediação com culturas bioenergéticas diminui o CO₂ atmosférico e ao mesmo tempo, torna-se um processo economicamente rentável, com a produção de energia.

De acordo com Ghnaya *et al.*, (2009), quando expostas a metais pesados, as plantas de colza apresentam uma correlação positiva entre os tempos de exposição aos metais tóxicos e a peroxidação de lípidos, com diminuição do teor de clorofila, dada a possível inibição de enzimas que permitem a sua biossíntese. Estes efeitos relacionam-se com a maior concentração de ERO induzida por alguns metais.

3. Materiais e Métodos

No presente capítulo será descrita a amostragem e os procedimentos seguidos ao longo da componente experimental deste estudo. Numa primeira fase descrevem-se os métodos da produção e manutenção das plantas, da contaminação com metais tóxicos e da recolha do material vegetal para as posteriores determinações analíticas.

3.1. Ensaio de rega

Para a realização dos ensaios experimentais foram utilizadas sementes de colza (*Brassica napus* L.).

O ensaio de produção da cultura de colza decorreu no Horto do Agrupamento de Química do Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas do Instituto Superior de Agronomia.

Numa primeira fase de germinação as plantas foram mantidas na câmara existente nas instalações do Horto, onde as condições para o desenvolvimento inicial da planta são mais favoráveis com temperaturas entre os 20 °C e os 25 °C e humidade relativa de cerca de 65%. As plantas, no interior da câmara, estavam ainda sujeitas a um fotoperíodo de 12h induzido por um conjunto de lâmpadas fluorescentes e foram regadas com água desionizada.

Para a germinação das sementes foram utilizados cilindros de substrato (Jiffy 7), daqui em diante substratos, humedecidos com água desionizada. Em cada substrato colocaram-se cinco sementes de colza e distribuíram-se 30 substratos por 10 tabuleiros, perfazendo um total de 300 substratos e 1500 sementes. Dada a rápida germinação das sementes, ao fim de 2 dias após a sementeira, as plantas foram colocadas na estufa onde foram mantidas até ao fim do ensaio. Para efeitos finais, foram contabilizadas 823 plantas, o que perfaz uma taxa de germinação de 54,9%, aproximadamente.

No período de desenvolvimento inicial, as plantas foram regadas com água desionizada. Após 20 dias da germinação iniciou-se a rega com solução nutritiva com adição do contaminante. Foram assim destinados 2 tabuleiros num total de 10, para cada situação experimental. A solução nutritiva utilizada no ensaio de rega foi a solução de Hoagland que tem na sua composição os constituintes descritos no Quadro 5. De modo a manter as plantas sempre com um nível de água indicado ao seu consumo e às condições climáticas da estufa, a rega foi constante ao longo do período do ensaio.

Quadro 5 - Composição da Solução Nutritiva de Hoagland utilizada no ensaio de rega

Solução de Macronutrientes	Solução de Micronutrientes	Solução Fe-EDTA
6 mM de Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	100 μM Ácido Bórico (H_3BO_3)	81,7 μM Fe-EDTA
6 mM de Nitrato de Potássio (KNO_3)	100 μM Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	
2,5 mM de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	30 μM Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	
1 mM de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)	1 μM Molibdato de Sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	
	0,1 μM Cloreto de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	
	0,1 μM Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	

A contaminação das plantas foi feita com recurso aos metais tóxicos As, Cd e Cu. Para além destes três elementos foi ainda objeto de estudo a tolerância das plantas de colza à salinidade, com a adição de NaCl. Todos os contaminantes foram adicionados juntamente com a solução nutritiva. Para efeitos de rega foram utilizados garrafões de 6 litros, cada um devidamente identificado com o elemento contaminante. Com o objetivo de manter um controlo sob as condições normais de crescimento e desenvolvimento das plantas de colza, foram mantidos dois tabuleiros designados como Testemunha, onde a solução nutritiva era a única componente na rega.

As concentrações de metal aplicado na rega foram previamente definidas. Desta forma utilizou-se uma concentração de 50 μM para o Cádmio e Arsénio e 100 μM para o Cobre. A concentração de Cloreto de Sódio utilizada nos ensaios foi de 25 mM.

3.2. Colheita das amostras

O ensaio de rega teve uma duração de 108 dias. Neste período foram colhidas plantas nos dias 38, 50, 59 e 66, que correspondem aos dias 18, 30, 39 e 46 de contaminação, respetivamente. O Quadro 6 indica o número de amostras (substratos) retirado de cada modalidade em cada uma das colheitas.

Quadro 6 - Número substratos retiradas de cada situação experimental nas colheitas.

	Testemunha	Cádmio	Cobre	Arsénio	NaCl
1ª Colheita	20	20	20	20	20
2ª Colheita	14	14	14	14	14
3ª Colheita	12	12	12	12	12
4ª Colheita	6	6	6	6	6

O objetivo primário das colheitas centra-se em dois tipos de determinação, em material seco e em material fresco. Desta forma, o procedimento em cada colheita divide-se em duas metodologias com diferentes tratamentos.

Para determinação de biomassa total as plantas foram contadas e pesadas, de onde se retirou o peso médio por planta, que será apresentado posteriormente.

Após a pesagem das plantas no seu todo, foram separados os caules das folhas. Nesta fase da colheita a metodologia difere consoante as determinações analíticas seguintes (material seco e material fresco). No caso das determinações de conteúdo mineral (material seco) foi necessária uma massa de folhas de cerca de 15 g em triplicado. Procedeu-se assim a uma lavagem das folhas com água desionizada e colocaram-se os triplicados na estufa a 60 °C. Seguidamente, o mesmo método é utilizado para os caules, que são cortados de forma a agilizar as determinações posteriores. Os caules foram colocados na estufa na sua totalidade.

Por outro lado, nas amostras que se destinam a determinações com material fresco, apenas foram usadas as folhas, que não são necessárias no material seco. Desta forma, foi retirada a nervura principal de cada folha e cortaram-se todas as folhas em partes de menor dimensão. Estas foram colocadas em pequenos pacotes de papel de prata, devidamente identificados, com cerca de 2,5 gramas cada, durante 5 minutos foram congeladas em azoto líquido. Após a sua congelação rápida as folhas foram transferidas para uma câmara de congelação com temperaturas de -80 °C.

No período de cada colheita foi ainda determinada a clorofila presente nas folhas de cada situação experimental com recurso ao aparelho *Hansatech*. A medição da clorofila fez-se em três pontos diferentes da folha obtendo-se assim três valores de clorofila para cada folha. No total, em cada tabuleiro, fez-se a medição da clorofila de 10 folhas.

3.3. Determinações analíticas nas plantas de colza

No seguimento da componente experimental deste trabalho, procedeu-se à análise laboratorial do material vegetal – seco e fresco. A Figura 5 ilustra a sequência de trabalhos laboratoriais desenvolvidos para os dois tipos de material.



Figura 5 - Diagrama de ações de cada colheita para determinações analíticas.

3.4. Determinações em Material Seco

3.4.1. Teor de matéria seca

Para determinação do teor de matéria seca, as amostras de material vegetal (folhas e caules) de cada contaminante, foram colocadas em estufa a uma temperatura de 60 °C. As amostras, previamente pesadas em fresco, foram novamente pesadas após 15 dias em estufa nas condições referidas. Desta forma, com as massas obtidas de material seco é possível estimar a percentagem ou teor de matéria seca definido como:

$$\%MS = \frac{M_{seca}}{M_{fresca}} \times 100$$

3.4.2. Conteúdo mineral das plantas de colza

Os métodos laboratoriais para análise da componente vegetal seca (folhas e caules) tiveram como objetivo principal a determinação quantitativa e qualitativa dos metais tóxicos em estudo, arsénio, cobre e cádmio, assim como dos elementos ferro, potássio, cálcio, sódio, manganês, magnésio e zinco.

Em primeiro lugar, para as determinações referidas realizaram-se digestões ácidas do material vegetal seco (folhas e caules). O método referido prevê a adição dos ácidos nítrico (7 ml) e clorídrico (2,5 ml) a tubos de teflon com cerca de 0,5 gramas de material seco, rigorosamente pesados (folhas ou caules). As amostras de cada situação experimental foram digeridas em triplicado.

A digestão ácida é um processo que submete o material seco a elevadas temperaturas permitindo a libertação de gases, o que conduz a uma digestão rápida da matéria orgânica. Todas as digestões atingiram temperaturas superiores a 100 °C e decorreram durante um período de 90 minutos, aproximadamente, num digestor DigiPREP MS. Com a digestão terminada procedeu-se a transferência do material digerido para balões volumétricos de 25 ml, perfazendo o volume com água desionizada. Esta ação teve lugar numa *hotte* devido à libertação de gases provenientes dos ácidos previamente adicionados.

Após as digestões dos caules e folhas, as determinações dos elementos minerais e tóxicos executaram-se num espectrofotómetro de absorção atómica em chama. Para leitura das absorvâncias de cada elemento nas amostras digeridas foram necessárias diluições dos extratos, de modo que todos os resultados estivessem no intervalo da curva padrão, selecionada consoante o elemento a determinar. É importante referir que os elementos As, Zn, Cu e Mn não carecem de diluição uma vez que a sua concentração original nas amostras se encontra dentro da curva padrão dos respetivos elementos.

Para as amostras contaminadas com arsénio, as leituras de absorvância foram determinadas num espectrofotómetro de absorção atómica em câmara de grafite.

3.4.3. Determinação dos elementos nas sementes de *Brassica napus*

Dando continuidade ao estudo da influência de metais pesados nos componentes da espécie *Brassica napus* L., procedeu-se à digestão ácida das sementes produzidas no ensaio, com o objetivo de determinar a quantidade de elemento contaminante (sódio, arsénio, cádmio e cobre) presente nas sementes.

As sementes foram recolhidas em vagens e colocadas em estufa durante 25 dias a 60 °C, para garantir a ausência de humidade no material vegetal. Com o objetivo de assegurar a homogeneidade das amostras no decorrer da digestão ácida, todas as sementes foram trituradas e posteriormente colocadas em tubos de *teflon* com cerca de 0,2 gramas de amostra em cada tubo, perfazendo-se um total de 15 amostras. A cada tubo de teflon, à semelhança do procedimento para caules e folhas, foram adicionados 8 ml de ácido nítrico e 2 ml de ácido clorídrico, seguindo-se a digestão que decorreu num período de 90 minutos onde se atingiram os 100 °C.

Já digeridas as amostras, estas foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, cujo volume total se preencheu com água desionizada. Mais uma vez, devido à elevada taxa de libertação de gases esta ação foi realizada em *hotte*.

Obtidos os extratos de todas as amostras, seguiram-se as leituras em espectrofotómetro de absorção atómica em chama, de forma a determinar o teor de metal tóxico na semente de cada situação experimental.

3.4.4. Determinação dos elementos no substrato

A germinação e crescimento das plantas de colza tiveram como suporte cilindros de substrato. Estes substratos foram recolhidos em cada colheita realizada, num total de quatro colheitas, e colocados em estufa a uma temperatura de 70 °C durante um período entre 15 a 20 dias. Depois de secos e armazenados em local sem humidade os substratos foram pesados e colocados nos tubos de digestão. A pesagem dos substratos oscilou entre as 0,4 gramas e as 0,1 gramas devido às várias repetições necessárias. Aos tubos de digestor foram adicionados 10 ml de ácido nítrico seguindo-se a digestão ácida no digestor de microondas (CEM MDS-2000). A Figura 6 exemplifica o método para digestão dos substratos (semelhante à digestão ácida de caules e folhas).

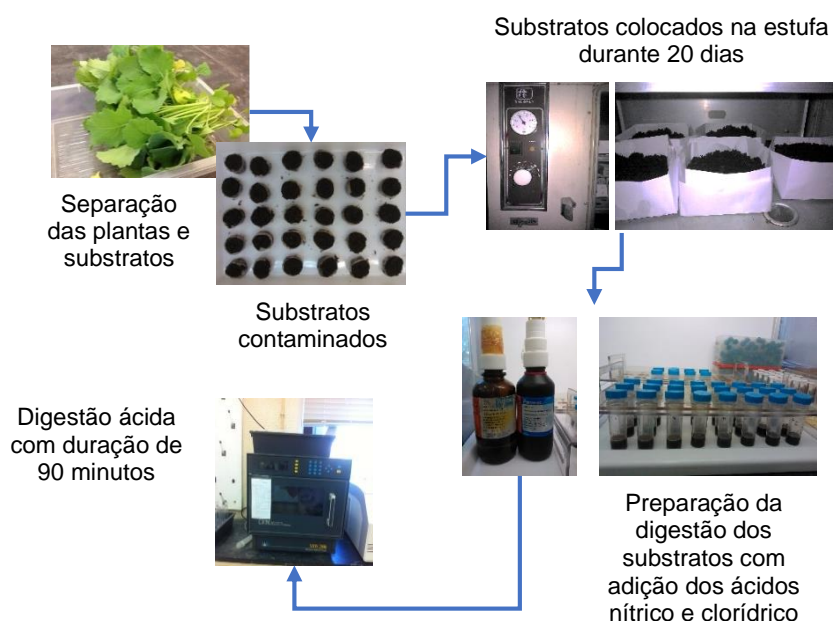


Figura 6 - Diagrama representativo da digestão ácida dos substratos.

Depois da digestão ácida do material, os extratos de cada amostra foram transferidos para balões volumétricos de 25 ml, cujo volume se fez com água desionizada. O método para determinação do teor de elemento tóxico em substratos foi semelhante aos realizados em caules, folhas e sementes com recurso ao espectrofotómetro de absorção atómica em chama.

Nesta determinação apenas foram efetuadas leituras dos componentes tóxicos adicionados durante o ensaio de rega.

3.5. Determinações em Material Fresco

3.5.1. Determinação da Peroxidação de Lípidos

Para a determinação do nível de peroxidação de lípidos recorreu-se a um método adaptado de Demiral & Turkan (2005), que através da espectrofotometria permite determinar a quantidade de MDA (malondialdeído) presente em cada amostra.

Seguindo o protocolo do método referido pesaram-se cerca de 0,5 gramas de amostra e procedeu-se à sua maceração adicionando 2,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1 % (p/v). Da amostra homogénea resultante da maceração procedeu-se à extração do material para *ependorfs* e à centrifugação do material durante 15 minutos a 12000 x g. Das amostras centrifugadas retirou-se 1 ml de sobrenadante para os tubos de ensaio aos quais foram adicionados 4 ml de solução de TCA + ácido tiobarbitúrico (TBA) 20% e 0,5% respetivamente. Seguidamente colocaram-se os tubos numa placa de aquecimento a 95 °C durante 30 minutos. Após os 30 minutos, com o propósito de parar a reação, os tubos foram sujeitos a um banho de gelo. O conteúdo dos tubos de ensaio foi novamente centrifugado durante 15 minutos a 10000 x g. Por fim, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 532 nm e 600 nm em *cuvettes* de vidro, no espectrofotómetro.

A concentração de MDA presente em cada amostra foi calculada da seguinte forma:

$$[\text{MDA}]_{\text{mM}} = \frac{\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}}{\epsilon} \quad (\text{mM})$$

Onde ϵ é o coeficiente de absorvidade molar do MDA, igual a 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

Para uma concentração de MDA expressa em µM/g PF:

$$[\text{MDA}] = \frac{[\text{MDA}]_{\text{mM}} \times 1000}{\text{massa}_{\text{amostra}}} \quad (\mu\text{M/g PF})$$

Onde $[\text{MDA}]_{\text{mM}}$ representa o valor obtido na primeira equação com um fator de conversão de mM para µM igual a 1000.

3.5.2. Determinação do Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂)

O método de determinação da concentração do peróxido de hidrogénio assemelha-se ao anterior para a determinação do nível de peroxidação de lípidos. Contudo, o processo segue a partir da extração, o método adaptado de Singh *et al.* de 2006.

Após a extração e centrifugação do material macerado transferiram-se 0,05 ml de sobrenadante das amostras para tubos de ensaio. Ao extrato de cada amostra foram adicionados 0,95 ml de solução tampão fosfato (100 mM) preparada em laboratório. Posteriormente, procedeu-se à leitura da absorvância a 390 nm em *cuvettes* de plásticos com adição prévia de 1 ml da solução de iodeto de potássio com 1 M, e agitação da amostra. A leitura da absorvância para determinação da concentração de peróxido de hidrogénio foi feita no espectrofotómetro.

A determinação da concentração de H_2O_2 tem como base de cálculo a seguinte equação:

$$[H_2O_2] = \frac{[H_2O_2]_{\mu g \text{ mL}^{-1}} \times volume_{extrato}}{massa_{amostra}} \times \frac{0,5}{volume_{sobrenadante}} \quad (\mu g \text{ H}_2\text{O}_2 / g \text{ PF})$$

3.6. Tratamento Estatístico

Os resultados obtidos nas determinações analíticas foram compilados e tratados estatisticamente com recurso ao programa SPSS Statistics 13.0.

Com o objetivo de avaliar as diferenças significativas entre os resultados obtidos para cada dia de colheita, aplicou-se a análise de variância a um fator (ANOVA), com o teste de Tukey, para um nível de confiança de 95%.

Na apresentação dos resultados, as letras minúsculas, no topo de cada coluna dos gráficos, indicam as diferenças significativas entre as médias nos diferentes dias de colheita (4 no total), para cada modalidade de ensaio (T, Cd 50 μ M, Cu 100 μ M, As 25 μ M, NaCl 25 mM). A presença do símbolo (*) representa diferenças significativas dos valores médios em relação à modalidade Testemunha. Sempre que se repete a mesma letra, significa que os valores médios são estatisticamente iguais, para $p < 0,05$.

As barras de erro, presentes nas colunas dos gráficos, representam o desvio-padrão (DP) da média das amostras de cada colheita.

4. Resultados e Discussão

4.1. Germinação e desenvolvimento das plantas de colza

No decorrer dos ensaios de germinação das plantas foram observadas e registadas as alterações fisiológicas visíveis no seu desenvolvimento.

A germinação das sementes de colza ocorreu dois dias após a sementeira e estimou-se uma taxa de germinação de, aproximadamente, 54,9 %. A Figura 7 representa a germinação das plantas, os primeiros cotilédones e o aparecimento da primeira folha.



Figura 7 - Memória fotográfica representativa da germinação (1), aparecimento de cotilédones (2) e primeira folha (3).

A contaminação das plantas iniciou-se 20 dias após a sementeira. O ensaio teve uma duração de 108 dias. A última colheita teve lugar no dia 66, correspondente ao dia 46 de contaminação. Os períodos de colheitas foram determinantes para aferir quais os efeitos da exposição prolongada das plantas de colza a elementos potencialmente tóxicos e à salinidade por NaCl. A Figura 8 engloba um conjunto de registos fotográficos que permitem perceber a evolução das plantas de colza durante o ensaio.



Figura 8 - Evolução das plantas de colza durante o período de ensaio de rega.

4.2. Efeitos dos EPT e Salinidade nos parâmetros fisiológicos

Na avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas de colza foram considerados a biomassa e o teor de matéria seca das folhas e caules.

4.2.1. Biomassa

A evolução da biomassa das plantas de colza foi determinada nas várias colheitas realizadas no ensaio da cultura de colza.

A Figura 9 representa os valores médios de biomassa para as 5 situações experimentais, sendo elas: Testemunha (T), e contaminações com Cádmio (Cd 50 μ M), Cobre (Cu 100 μ M), Arsénio (As 50 μ M) e Cloreto de sódio (NaCl 25 mM).

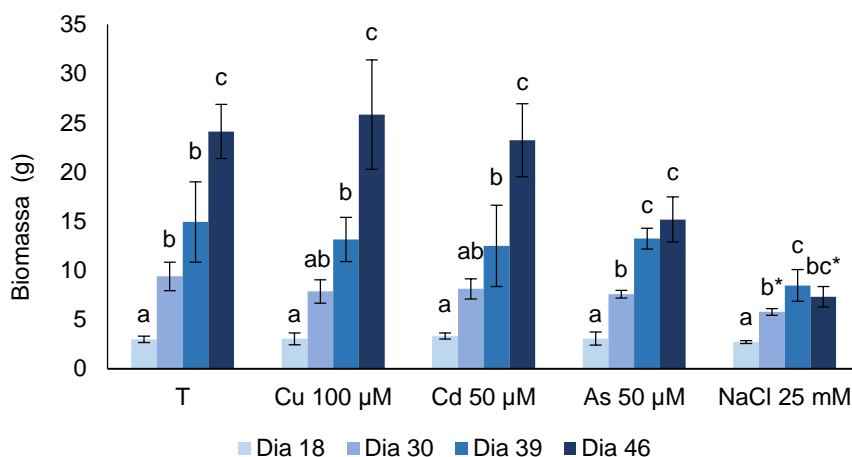


Figura 9 - Biomassa média das plantas em estudo ao longo de 18, 30, 39 e 46 dias de contaminação. As letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias e para cada modalidade de ensaio. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

Na análise de resultados da biomassa das plantas de colza pode afirmar-se que a maior diferença se encontra nas plantas expostas a As e NaCl. Comparativamente com o comportamento da Testemunha, a exposição a Cd e Cu não revela diferenças no normal desenvolvimento das plantas, mesmo para os períodos mais prolongados de exposição. As diferenças de biomassa são mais acentuadas entre os dias 39 e 46, no caso das modalidades de T, Cu e Cd. Por sua vez, os resultados para as concentrações de As e NaCl são mais homogêneos, não se verificando tantas discrepâncias nos valores médios de biomassa entre as diferentes colheitas.

No caso da salinidade, os resultados mostram uma menor tolerância das plantas. Na fase terminal – entre o dia 39 e 46 – verifica-se mesmo, o decréscimo de biomassa.

As plantas contaminadas com As, apesar de manterem uma produtividade crescente e constante, apresentam um nível de biomassa inferior ao das plantas não contaminadas. Estes resultados levam a crer que o As aciona mecanismos de defesa na planta relacionados com o seu crescimento.

Numa perspetiva holística, pode então afirmar-se que o NaCl e a exposição ao elemento tóxico As afetam diretamente a produção de biomassa, o que conduz a uma menor produtividade da planta de colza.

4.2.2. Teor de Matéria Seca das Folhas e Caules

Com a realização das colheitas ao longo do período de ensaio, foi também estudada a evolução da % de matéria seca (MS) das folhas e dos caules das plantas de colza. A Figura 10 demonstra os valores obtidos de matéria seca para as diferentes modalidades de ensaio, com base no peso fresco e peso seco das plantas em estudo.

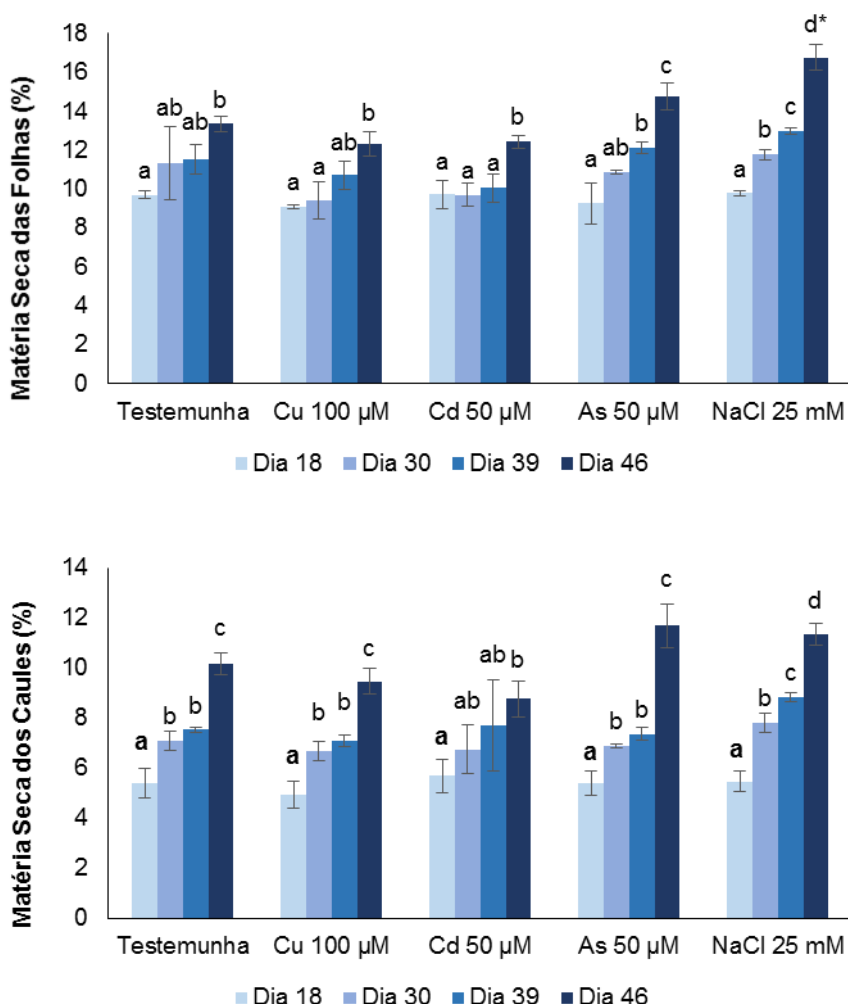


Figura 10 - Teor de matéria seca (%) nas folhas e caules no período de exposição (46 dias). As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 µM, Cd 50 µM, As 50 µM, NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

Observando os resultados obtidos na quantificação da percentagem de matéria seca das folhas e caules, é visível que a maior expressividade se verifica no último dia das colheitas, para qualquer modalidade de ensaio, tanto para folhas como para os caules. Este resultado pode estar relacionado com a diminuição da absorção de alguns elementos minerais e de água, o que afeta o crescimento regular da planta, indicando efeito tóxico.

Na comparação com a Testemunha, observa-se uma tendência para a diminuição da % de MS no caso das contaminações com Cu e Cd, no caso das folhas. No entanto esta diferença não é suficiente para que se considerem os resultados estatisticamente diferentes da Testemunha. No decorrer do período de contaminação é possível verificar que nestas modalidades a % de MS se mantém constante, ocorrendo os maiores valores no dia 46.

Os caules não manifestam diferenças significativas quando comparados com a Testemunha, por sua vez as folhas mostram uma diferença no caso da exposição a NaCl, onde são visíveis diferenças no dia 46. As diferenças no desenvolvimento dos componentes fisiológicos das plantas estão associadas a níveis de salinidade superior à tolerância da planta. Isto pode ser explicado, pela perturbação do potencial osmótico da planta, limitando a absorção de outros nutrientes essenciais ao normal crescimento das plantas de colza.

Em todas as modalidades de ensaio, os resultados apresentam uma tendência crescente na percentagem de matéria seca, tanto nas folhas como nos caules.

4.3. Efeitos dos EPT e Salinidade no Teor de clorofila – *Hansatech*

No decorrer do período de contaminação das plantas de colza, um dos parâmetros mais visíveis e que reflete o stresse induzido por metais pesados e salinidade é o teor de clorofila. A Figura 11 ilustra os diferentes teores de clorofila medidos através do aparelho *Hansatech*.

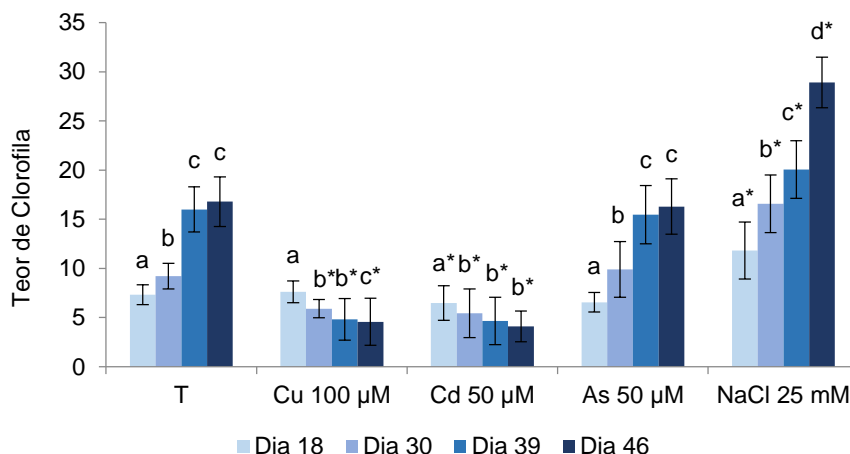


Figura 11 - Teor médio de clorofila (sem unidades), para os ensaios dos vários elementos adicionados durante 46 dias. As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 µM, Cd 50 µM, As 50 µM, NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

Pela análise dos resultados do teor de clorofila, pode afirmar-se que este é um parâmetro com uma variância expressiva nas modalidades em estudo. A observação de diferenças significativas neste parâmetro é visível ao nível foliar.

Na comparação com a modalidade Testemunha, as plantas contaminadas com arsénio revelam um teor de clorofila semelhante. Não se pode por isso afirmar que a contaminação por As seja visível neste parâmetro. Por outro lado, os metais Cu e Cd, apresentam diferenças significativas quando comparados com a Testemunha, isto pode acontecer por danos causados na clorofila, por limitações à síntese de clorofila, ou por combinações de ambos. Por sua vez, o excesso de NaCl na solução de rega, que condicionou o crescimento da planta – já comprovado pela biomassa – revela elevados valores no teor de clorofila. Isto pode ser explicado pela maior concentração deste pigmento ao nível foliar. Uma vez condicionado o crescimento da planta, a clorofila concentra-se nas folhas, levando por isso a teores superiores aos da Testemunha, que apresenta um desenvolvimento regular.

Numa outra perspetiva, quando comparadas as colheitas, após os dias de contaminação, registam-se as maiores diferenças entre a 2ª e 3ª colheitas. Este facto pode ser explicado pela maior taxa de crescimento das plantas de colza entre os dias 30 e 39 de contaminação, para todas as modalidades com exceção da salinidade. No caso das plantas sujeitas a concentrações elevadas de NaCl, a diferença no teor de clorofila é mais pronunciada entre os dias 39 e 46, onde se verifica um decréscimo na biomassa das plantas. Estes resultados reforçam a ideia de que existe uma maior concentração de clorofila nas folhas desta modalidade. Pode assim afirmar-se que o teor de clorofila e a biomassa das plantas de colza, quando sujeitas a NaCl, são inversamente proporcionais.

Todas as diferenças encontradas no teor de clorofila foram registadas ao longo do ensaio de rega. As diferentes colorações das folhas de colza revelam por si só stresse induzido pelos elementos tóxicos. A Figura 12 ilustra algumas das diferenças registadas nas diferentes modalidades.

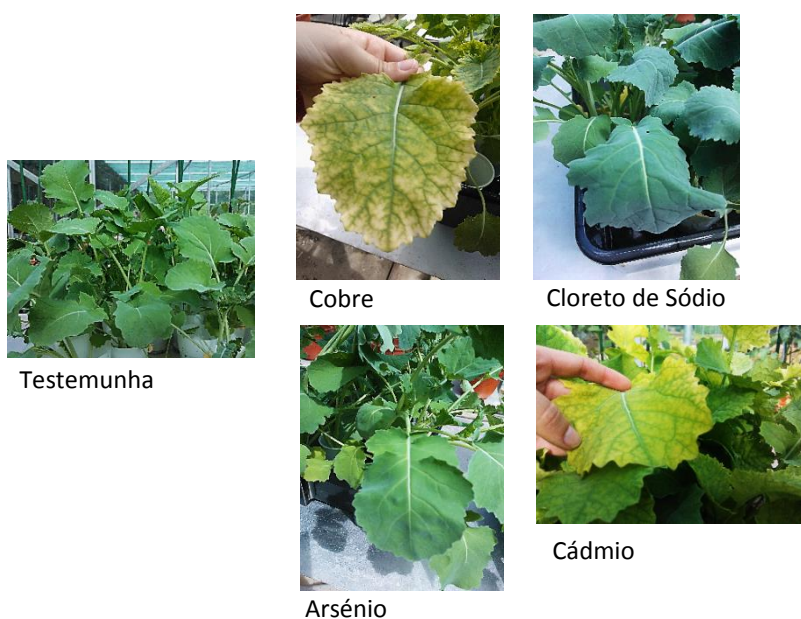


Figura 12 - Efeitos da contaminação com os elementos em estudo nas plantas de colza (folhas).

4.4. Avaliação do conteúdo mineral

4.4.1. Conteúdo mineral no substrato

As Figuras 13 e 14 evidenciam as concentrações dos elementos As, Cd, Cu e NaCl, nos substratos de cada colheita.

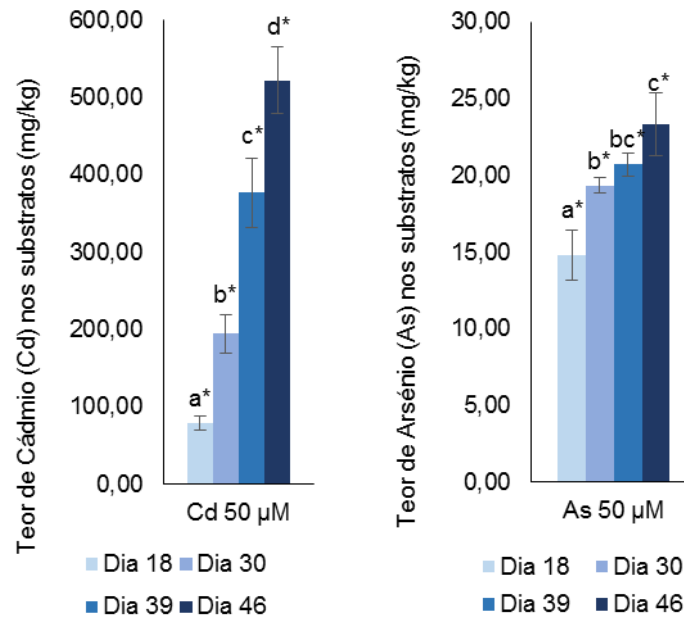


Figura 13 - Concentração dos elementos Cd, As nos substratos. As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 M, Cd 50 M, As 50 e NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

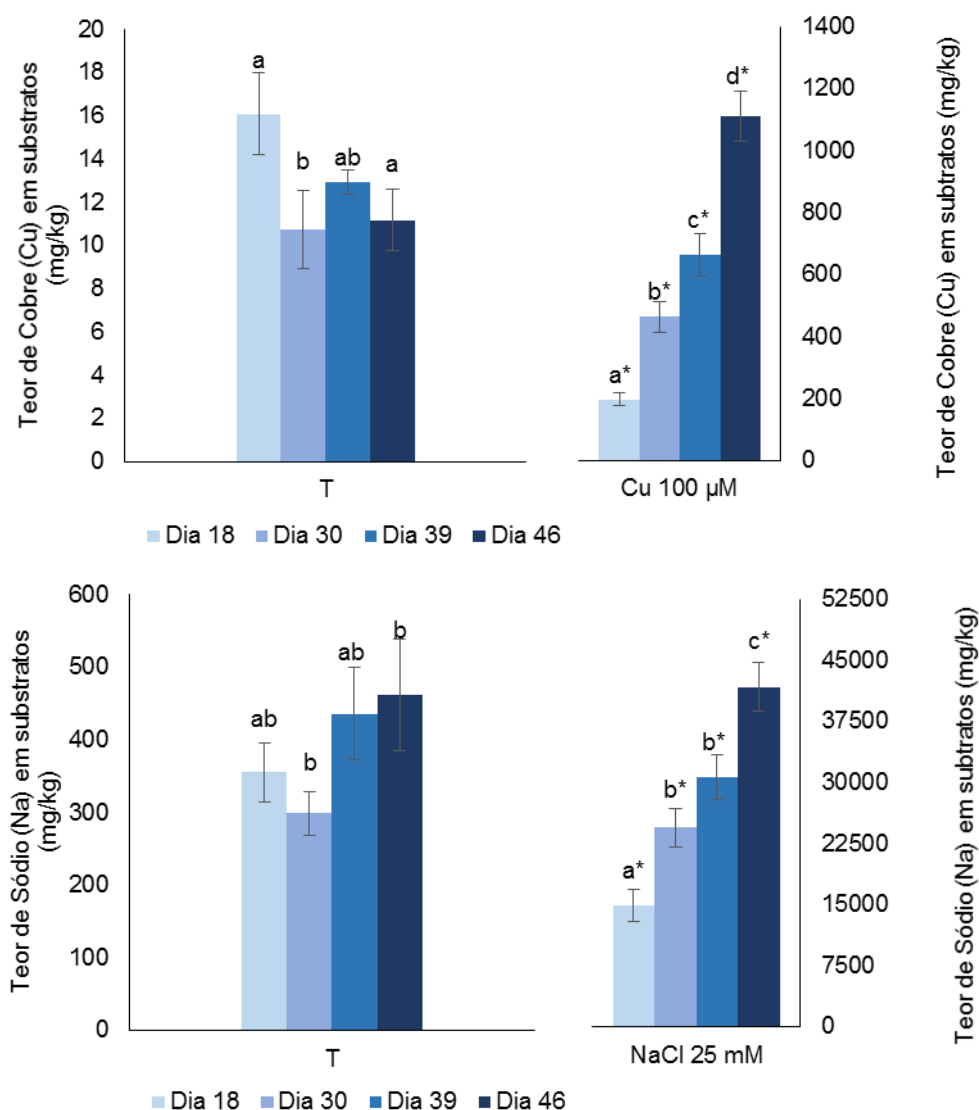


Figura 14 - Concentração dos elementos Cu e Na nos substratos. As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 M, Cd 50 M, As 50 e NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

Numa análise global, é visível o aumento da concentração dos elementos potencialmente tóxicos nos substratos. Na comparação dos vários elementos deve ser tido em conta que a concentração é dada em termos de massa do elemento, em miligramas, para 1 quilograma de matéria seca de substrato.

A entrada de elementos minerais no substrato no decorrer do ensaio de rega, é diferente entre as modalidades em estudo. Tendencialmente, os elementos Na e Cu apresentam uma maior concentração no substrato nos vários dias de colheitas, sendo elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas.

Por sua vez, os elementos Cd e As evidenciam concentrações mais baixas, em particular o elemento As, cuja concentração no substrato é cerca de 20 vezes inferior à do Cd.

De forma a enquadrar a incorporação destes elementos no solo é necessário ter em conta o conceito de adsorção de cátions por atração eletrostática, que resulta numa capacidade de troca catiónica, por reter os cátions numa forma permutável, evitando a sua perda por lixiviação e mantendo-os disponíveis para as plantas (Varennnes, 2003). Neste sentido as diferentes concentrações dos elementos em estudo relacionam-se com a capacidade de adsorção do substrato, mas também com as concentrações de elemento tóxico adicionadas. Nesta perspetiva pode assumir-se, em termos de adsorção do elemento no substrato, a seguinte sequência $Na > Cu > Cd > As$.

4.4.2. Conteúdo mineral nas plantas de colza – Caules, Folhas e Sementes

Na continuidade do estudo do efeito dos EPT e da salinidade nas plantas de colza, apresentam-se os resultados da concentração de diferentes minerais nas plantas em estudo.

De forma a tornar mais perceptível a deslocação dos vários elementos nas plantas, apresenta-se a evolução das concentrações (mg de elemento por kg de matéria seca) para folhas e caules, nas várias colheitas. Por último, e para que seja possível aferir a translocação dos elementos minerais nos vários componentes da plantas, é referida a concentração de mineral presente nas sementes nas modalidades contaminadas com As, Cd, Cu e NaCl.

4.4.2.1. Arsénio

Na Figura 15 constam as concentrações de arsénio (mg As/kg de MS) nas folhas e caules nos vários períodos de colheita. O teor de As foi determinado apenas nos extratos obtidos após a digestão das plantas contaminadas com este elemento.

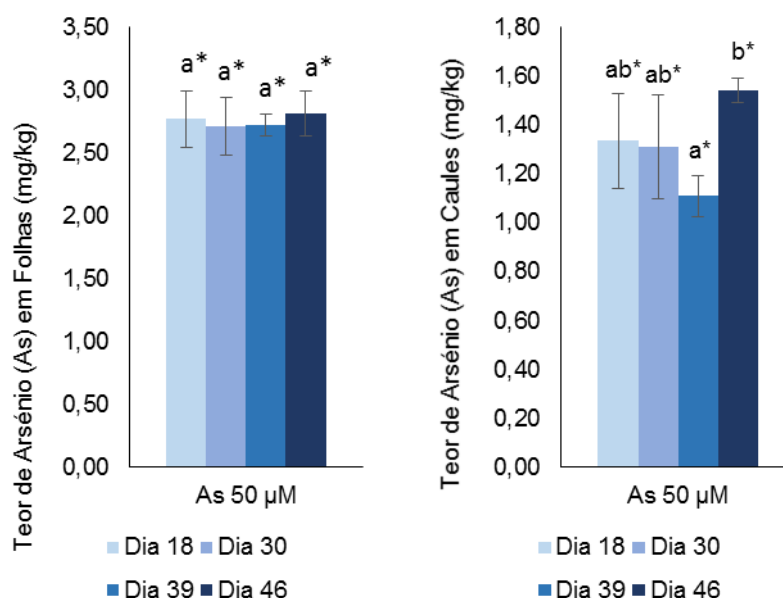


Figura 15 - Teor de As (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de As e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações de Arsénio e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Por observação dos gráficos anteriores é possível afirmar que a concentração de As é superior nas folhas, comparativamente com os caules, conferindo aos segundos um papel de elementos condutores de minerais, onde a absorção pelos tecidos é mais baixa.

A presença de As nos caules é mais heterogênea, quando comparados com as folhas, havendo um teor de As mais baixo no dia 39. Esta variação mais acentuada pode ser explicada pelo desenvolvimento da planta e pela menor taxa de absorção de solução de rega neste período.

As plantas da modalidade As desenvolveram-se sem danos foliares. No entanto, numa fase inicial, as plantas desta modalidade apresentaram um retardamento no

crescimento, facto que foi ultrapassado nos últimos dias de contaminação, onde houve a formação de flores e sementes, em quantidade considerável.

O teor de arsénio detetado nas sementes de colza igualou 1,5 mg de As por kg de matéria seca. Este resultado prova que este elemento atinge o produto final da cultura da colza. Numa produção de colza em grande escala e em solos contaminados com arsénio, esta planta manifesta um potencial de absorção deste elemento, ainda que em baixas concentrações.

4.4.2.2. Cádmio

A Figura 16 apresenta as concentrações do elemento Cd nos diferentes momentos das colheitas, em plantas contaminadas com este elemento.

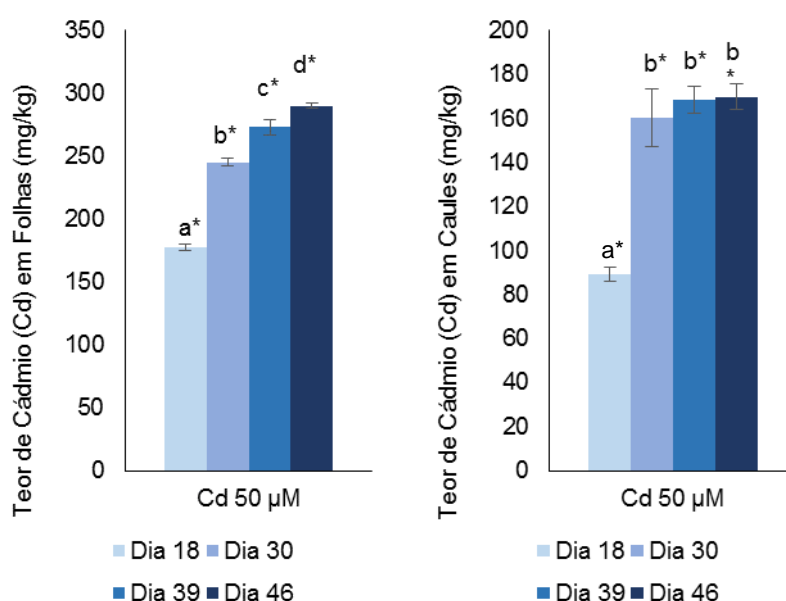


Figura 16 - Teor de Cd (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de Cd e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações de Cádmio e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

A avaliação do teor de cádmio na modalidade testemunha não detetou a presença deste elemento, o que significa que o teor de Cd se encontra abaixo do limite de deteção, como seria de esperar. Mais uma vez, é visível a maior concentração de Cd ao nível foliar, destacando-se uma razão diretamente proporcional entre o tempo de exposição e as concentrações de Cd detetadas em folhas e caules. A concentração de Cd nos caules apresenta a sua maior diferença no dia 18 de contaminação, mantendo-se depois praticamente constante ao longo do tempo.

Na análise feita no decorrer do ensaio de rega, foi possível observar diferenças consideráveis no aspeto das folhas desta modalidade. O crescimento da planta propriamente dito não foi afetado, acompanhando sempre a modalidade de testemunha. No entanto, no período de desenvolvimento de flores e sementes, as plantas contaminadas com Cd destacaram-se por serem as últimas a formar inflorescências. Nestas plantas houve formação de sementes ainda que em pouca quantidade. As sementes das plantas da modalidade exposta a este metal tóxico, revelaram concentrações de Cd iguais a 6,3 mg por kg de matéria seca. Este metal atinge assim as camadas superiores das plantas de colza em quantidades consideráveis.

Pode assim concluir-se que as plantas de colza acumulam cádmio em concentrações consideráveis ao nível foliar, sendo visíveis diferenças no crescimento e desenvolvimento das plantas.

4.4.2.3. Cálcio

A Figura 17 agrupa os resultados de concentrações de Ca (mg/kg de matéria seca) nos diferentes dias de colheita, em folhas e caules.

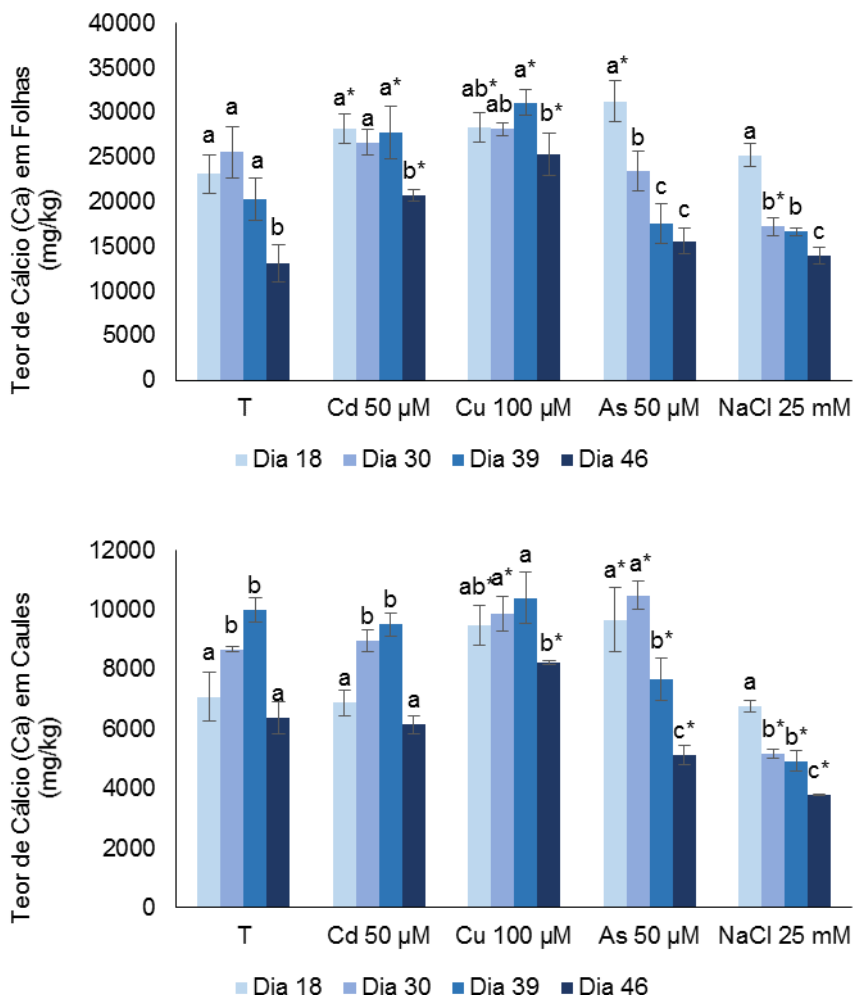


Figura 17 - Teor de Ca (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Por observação dos gráficos da Figura 17 é visível a oscilação na absorção deste mineral ao nível foliar e dos caules, tanto para a modalidade Testemunha como para as restantes.

Na absorção de Ca pelas plantas de colza, o comportamento mais regular e que apresenta uma tendência decrescente, encontra-se nas modalidades contaminadas com As e NaCl. Nestas modalidades, a absorção de Ca é menor para tempos de

exposição mais longos. No entanto, ao nível foliar, as concentrações destas modalidades não são significativamente diferentes dos resultados para a modalidade Testemunha.

Por sua vez, os elementos Cd e Cu revelam teores de Ca elevados e com decréscimo apenas no último dia de colheita (46).

Numa perspetiva transversal, é visível que todas as modalidades apresentam menores concentrações de Ca no período de exposição mais longo – dia 46 – tanto nos caules, como nas folhas. Este facto pode ser explicado, pela menor taxa de absorção das plantas ou pelos elevados níveis de contaminação a que estavam sujeitas. No período final de contaminação foi visível em todas as modalidades uma menor absorção da solução nutritiva, relacionando-se assim com a menor absorção de Ca.

Na observação das plantas ao longo do período de ensaio, as modalidades de Cd e Cu, em comparação com a modalidade Testemunha, demonstraram não afetar negativamente o crescimento das plantas. No entanto, numa fase final de ensaio, estas modalidades revelaram ser as que mais afetaram o desenvolvimento de flores e sementes. A absorção de Ca foi também mais baixa no último período, o que pode estar relacionado com o fraco desenvolvimento das plantas.

De acordo com o Quadro 1 (ver capítulo 2.1) as concentrações normais de cálcio nas plantas assumem valores entre 2000 e 40000 mg de cálcio por kg de matéria seca. Incluindo as plantas de colza nesta gama pode assumir-se que, a absorção de Ca não foi afetada pelas modalidades em estudo, uma vez que não se ultrapassam os limites estabelecidos.

4.4.2.4. Cobre

A Figura 18 apresenta as concentrações do micronutriente Cu nos diferentes momentos de colheita, das plantas de colza.

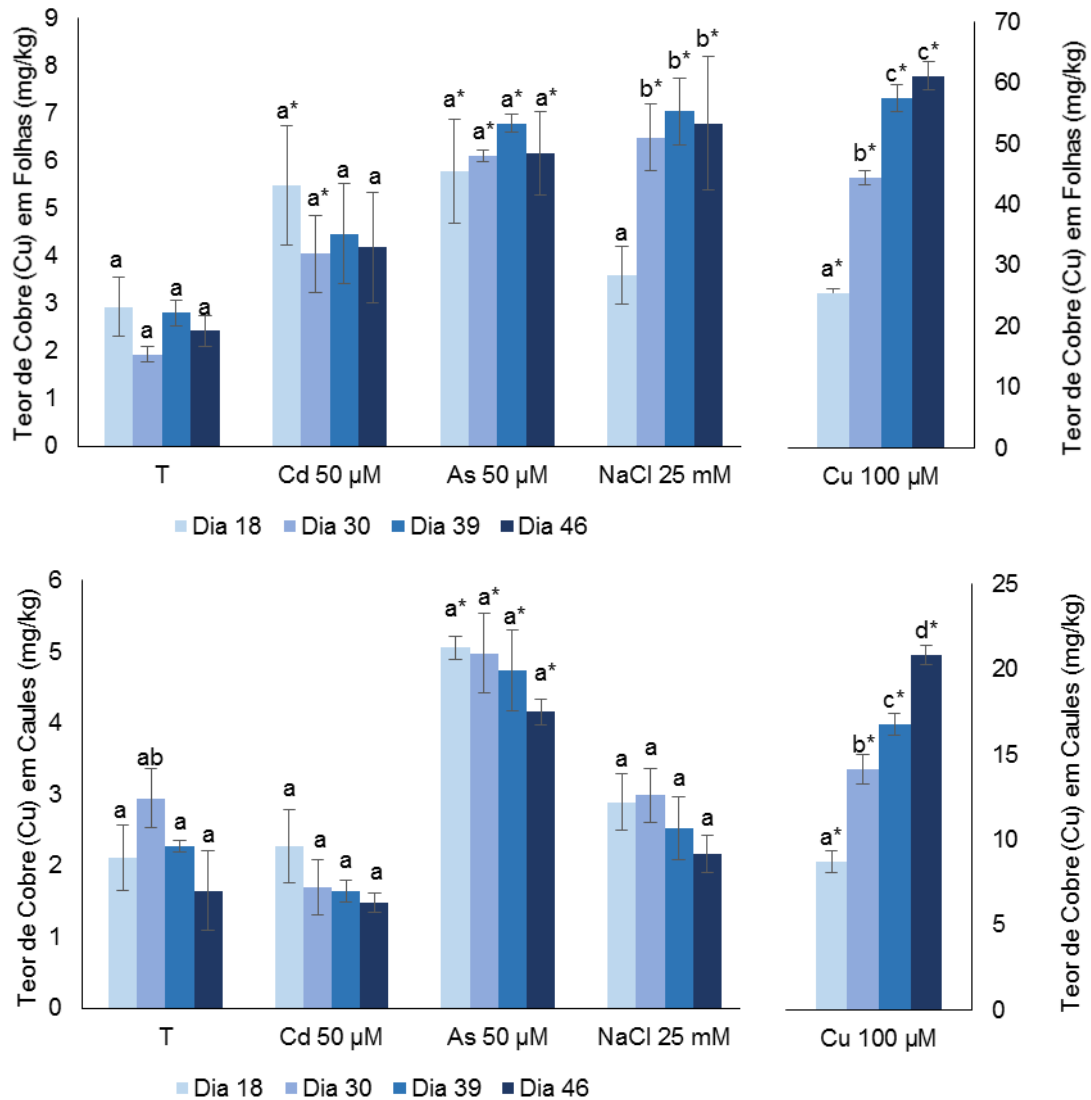


Figura 18 - Teor de Cu (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Na comparação entre os componentes da planta caules e folhas, destaca-se mais uma vez o papel condutor dos caules, uma vez que a absorção de Cu nestes tecidos é sempre mais baixa quando comparada com as concentrações determinadas nos tecidos foliares. Visualmente, os efeitos da contaminação com Cu são mais evidentes nas folhas. A contaminação com Cu nas plantas de colza mostrou afetar negativamente o desenvolvimento das plantas. No decorrer do ensaio foram observadas diferenças significativas no nível de clorofila das folhas contaminadas com Cu, e o aparecimento de necroses e cloroses por diminuição da absorção de outros micronutrientes essenciais, como o Fe. As plantas de colza sujeitas ao excesso de Cu acompanharam o crescimento normal da planta quando comparadas com a Testemunha, no entanto, na fase final mostraram sinais de estagnação no seu desenvolvimento, nomeadamente ao nível da produção de sementes. Nesta modalidade de contaminação, as plantas secaram precocemente e não ocorreu a formação de semente.

O Cu ocupa um papel de micronutriente essencial às plantas e por isso, a composição qualitativa da solução de Hoagland (solução nutritiva) inclui este mineral, na forma de sulfato de cobre. A absorção de Cu pelas restantes modalidades é então inevitável. De um modo geral, o elemento cobre assume concentração entre 5 e 20 mg de Cobre por kg de matéria seca (ver capítulo 2.1).

Em comparação com a modalidade Testemunha não se pode afirmar que os elementos tóxicos Cd e As e o NaCl afetem negativamente a absorção de Cu.

4.4.2.5. Ferro

Na Figura 19 demonstram-se os resultados obtidos para teor de Fe nas plantas de colza.

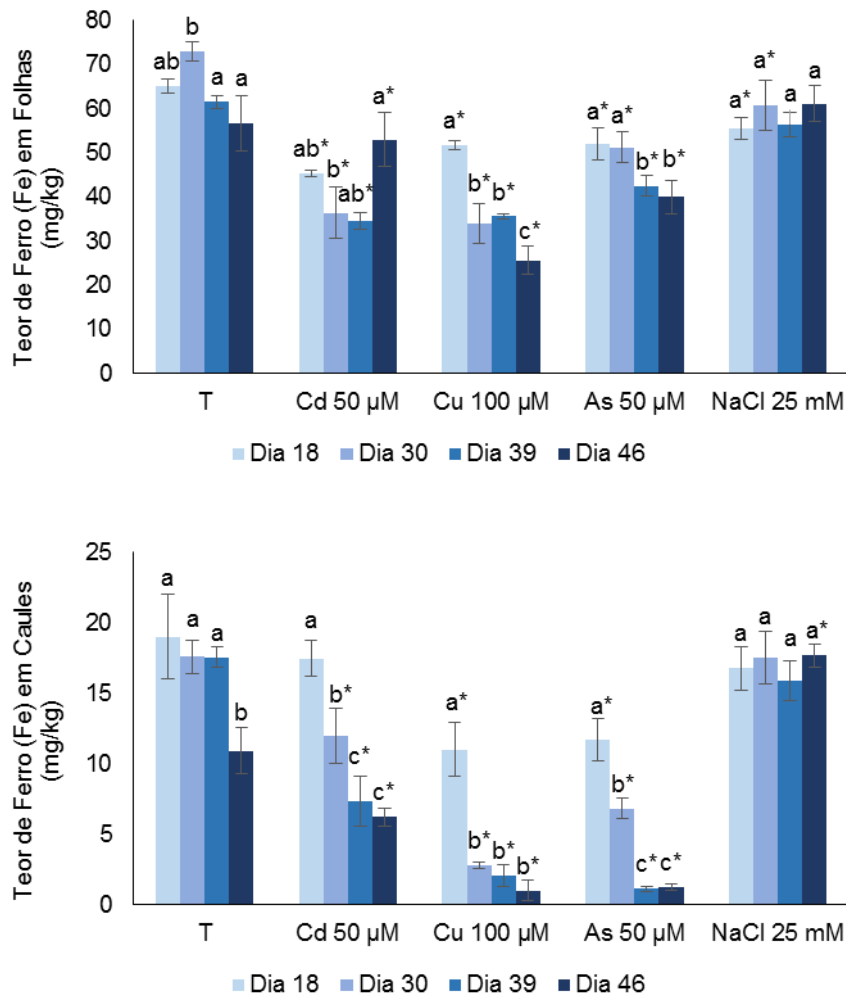


Figura 19 - Teor de Fe (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Os teores normais do elemento Fe nas plantas variam entre 50 a 250 mg de ferro por kg de matéria seca (ver capítulo 2.1). Assumindo estes valores para as plantas de colza, verificam-se diferenças significativas nas 5 modalidades de ensaio.

Na análise do conteúdo do mineral ferro nas plantas de colza, a maior concentração encontra-se na modalidade Testemunha. Os efeitos dos EPT e da salinidade são assim sentidos na absorção de ferro pela planta.

A concentração de Fe destaca-se nas folhas com valores próximos de 80 mg/kg de MS para a modalidade Testemunha no segundo dia de colheita. Para esta modalidade, a absorção pelos caules é menor e decresce no decorrer do tempo de ensaio.

Na comparação com as plantas Testemunha, as que mais se aproximam dos valores normais são as plantas expostas à salinidade por NaCl, onde os valores não diferem substancialmente.

A adição de Cu, como elemento contaminante, exerce um efeito claramente negativo na absorção de Fe, sendo o seu valor cada vez menor para tempos de exposição mais longos. O comportamento verificado em caules e folhas é semelhante (decréscimo acentuado), no entanto a absorção de Fe pelos caules é muito inferior ao da modalidade Testemunha. O efeito do excesso de Cu foi visível no decorrer do ensaio de rega, uma vez que as folhas mostravam sintomas claros de deficiência de Fe, denunciando cloroses e necroses associadas à ausência deste elemento mineral.

O efeito do Cd revela-se também negativo na absorção e acumulação de Fe nos dois componentes da planta - caules e folhas. Ao nível dos caules, a absorção de Fe, ao longo do período de contaminação, diminui. Este decréscimo verificou-se também para as folhas, com exceção do último dia de colheita - dia 46 - onde a absorção de Fe aumentou. As plantas contaminadas com Cd demonstraram também sintomas de deficiência de Fe, à semelhança do que ocorreu nas plantas contaminadas com Cu.

No acompanhamento do ensaio de rega, as plantas de Cd e Cu foram as que mais manifestaram problemas. As plantas contaminadas mostraram uma evolução normal ao nível de crescimento, mas numa fase final ocorreu uma estagnação no desenvolvimento das plantas, sendo estas modalidades as que apresentaram menor produção de flores e de sementes.

Por fim, o As mostrou afetar a absorção de Fe com maior expressão nos caules. Ao nível foliar, a absorção de Fe foi inferior à modalidade Testemunha, no entanto as folhas não apresentaram sintomas como as de Cd e Cu, pelo que supõe que a contaminação por As não provoca danos ao nível foliar.

Pode assim afirmar-se que, o As e o NaCl, são os que menos condicionam a absorção de Fe, ao contrário dos elementos Cd e Cu que evidenciam sintomas graves de fraca absorção de Fe.

4.4.2.6. Magnésio

A Figura 20 evidencia o teor de Mg presente nas folhas e caule de colza no decorrer do ensaio.

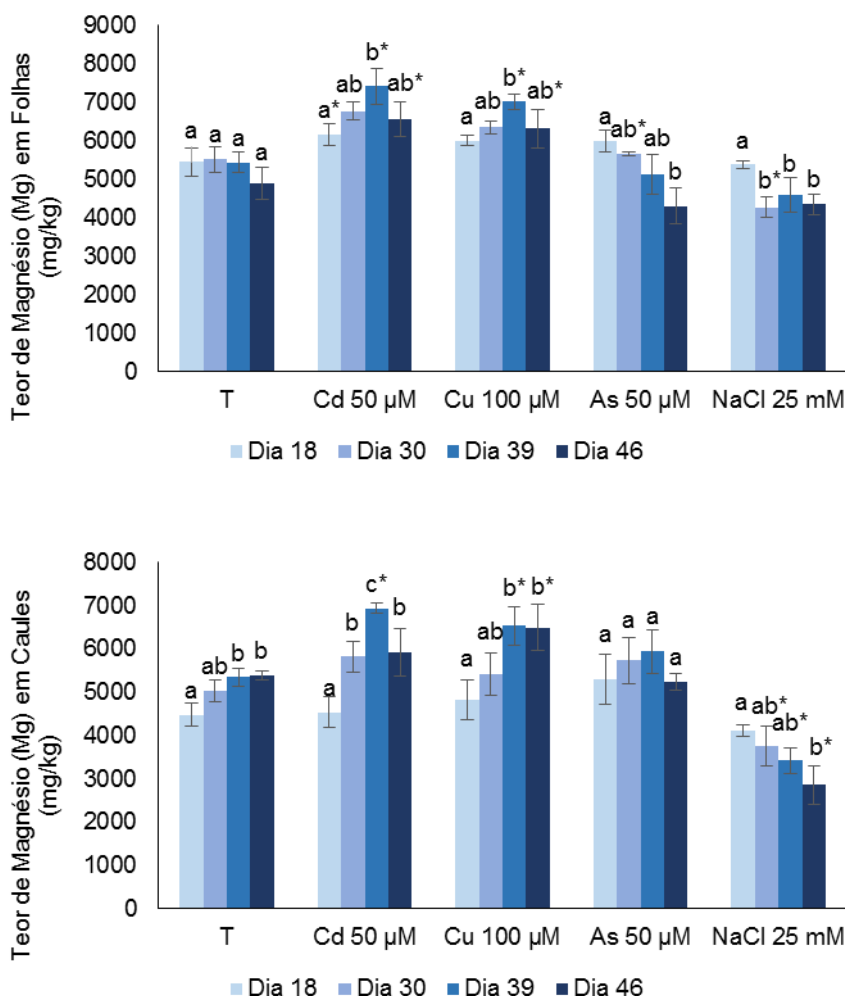


Figura 20 - Teor de Mg (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Na avaliação do conteúdo mineral em Mg os resultados apontam para concentrações muito próximas nos caules e folhas, e registam-se algumas variações nas diferentes modalidades. Deve ser tido em conta, que a concentração normal de Mg varia entre 1000 e 8000 mg de elemento por kg de MS.

Começando pela modalidade Testemunha a concentração de Mg é crescente nos tecidos dos caules, assumindo-se que existe assim uma maior tendência para a

acumulação de Mg nos caules, no decorrer do tempo de exposição. Por outro lado a concentração deste mineral nas folhas é constante, com uma ligeira diminuição no último período de ensaio. Daqui pode concluir-se que, nos primeiros dias de ensaio a concentração de Mg é menor nos caules, ficando maior parte do magnésio retido nas folhas. Com o desenvolvimento da planta, a concentração de Mg aumenta gradualmente nos caules e as folhas sofrem um ligeiro decréscimo. Apesar das oscilações nos valores de concentrações de Mg, este mineral apresenta concentrações muito próximas entre as folhas e os caules, entre 5000 e 6000 mg/kg de MS.

A presença de Cd e Cu pode ser analisada em conjunto uma vez que o comportamento na mobilidade de Mg na planta é muito semelhante. A adição destes metais não afeta a absorção de Mg pelas plantas, pelo contrário, a concentração de Mg é superior à modalidade testemunha de um modo geral. Os caules e as folhas apresentam valores de concentração entre 4000 e 7000 mg/kg de MS, para caules, e entre 6000 e 8000 mg/kg de MS para as folhas. A concentração de Mg é superior no terceiro momento de colheita - dia 39 -, onde atinge o valor máximo tanto em caules como em folhas.

Por sua vez, o As apresenta resultados mais próximos da modalidade Testemunha. A concentração de Mg decresce ao nível foliar e apresenta um aumento nos tecidos dos caules, com exceção da última colheita. A concentração deste EPT não afeta a concentração de Mg, ao nível dos caules, dados os valores muito próximos da modalidade não contaminada. Por sua vez ao nível foliar, a concentração de Mg apresenta uma tendência decrescente podendo significar, que o As provoca deficiência na absorção de Mg pelos tecidos foliares.

Em última análise, na modalidade de NaCl é visível uma diminuição da concentração de Mg ao longo do tempo de exposição, tanto em folhas como em caules. Este resultado deve-se sobretudo ao efeito antagónico entre os minerais Na e Mg. A presença de Na, enquanto macronutriente, dificulta a absorção de Mg, facto que se verifica com a observação da Figura 20. Este antagonismo é regular e verifica-se com outros minerais.

4.4.2.7. Manganês

A concentração de Mn determinada para cada momento de colheita e no decorrer da contaminação pode observar-se na Figura 21.

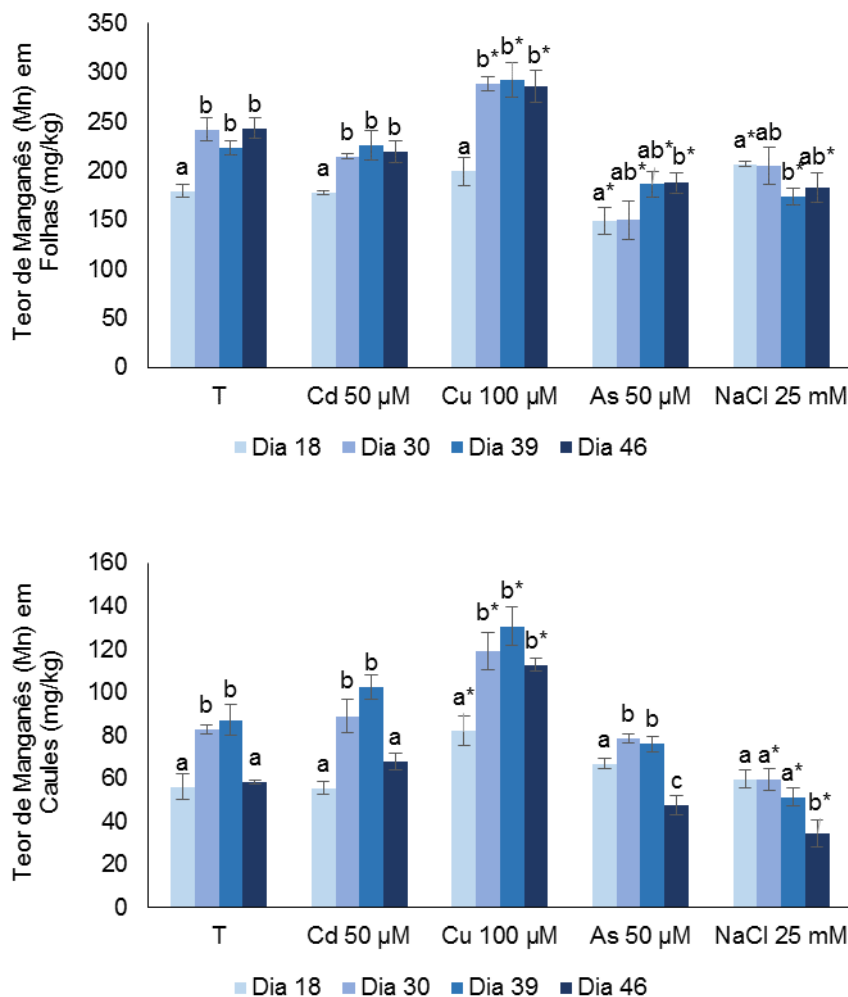


Figura 21 - Teor de Mn (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

O conteúdo em Mn assume valores superiores ao nível dos tecidos foliares, em relação aos caules. De um modo geral, a concentração de Mn é menor no primeiro dia de colheita, mantendo-se depois constante nas seguintes colheitas. Este padrão verifica-se apenas no caso das folhas. Nos caules, a última colheita revelou concentrações de manganês inferiores.

A exposição ao metal tóxico Cd não afetou a absorção de Mn pelos tecidos das plantas de colza, não existindo diferenças significativas entre as concentrações de Mn para as plantas expostas ao Cd e a modalidade Testemunha.

O Cu exerceu sobre as plantas um efeito que conduziu a uma maior concentração de Mn tanto nos tecidos foliares como nos caules.

A absorção de Mn pelas plantas exposta a As e NaCl foi inferior à da modalidade Testemunha, sendo possível afirmar que estes são os que mais diferenças apresentam ao nível da concentração de Mn, nas folhas. Apesar da concentração de Mn nos caules ser inferior à modalidade Testemunha esta diferença não se considera elevada, para o elemento As.

Numa análise geral, pode afirmar-se que ao nível foliar o As e NaCl exercem pressões negativas na absorção de manganês, mas que não são suficientes para afirmar uma deficiência deste micronutriente uma vez que os teores não se encontram abaixo dos limites mínimos 20 mg de Mn por kg de MS (ver capítulo 2.1). Nos tecidos dos caules, este efeito de diminuição da concentração ao longo do tempo de exposição verifica-se apenas ao nível da salinidade.

4.4.2.8. Potássio

A Figura 22 composta pelos gráficos de concentração de K em folhas e caules demonstra a evolução do teor deste macronutriente no período de ensaio.

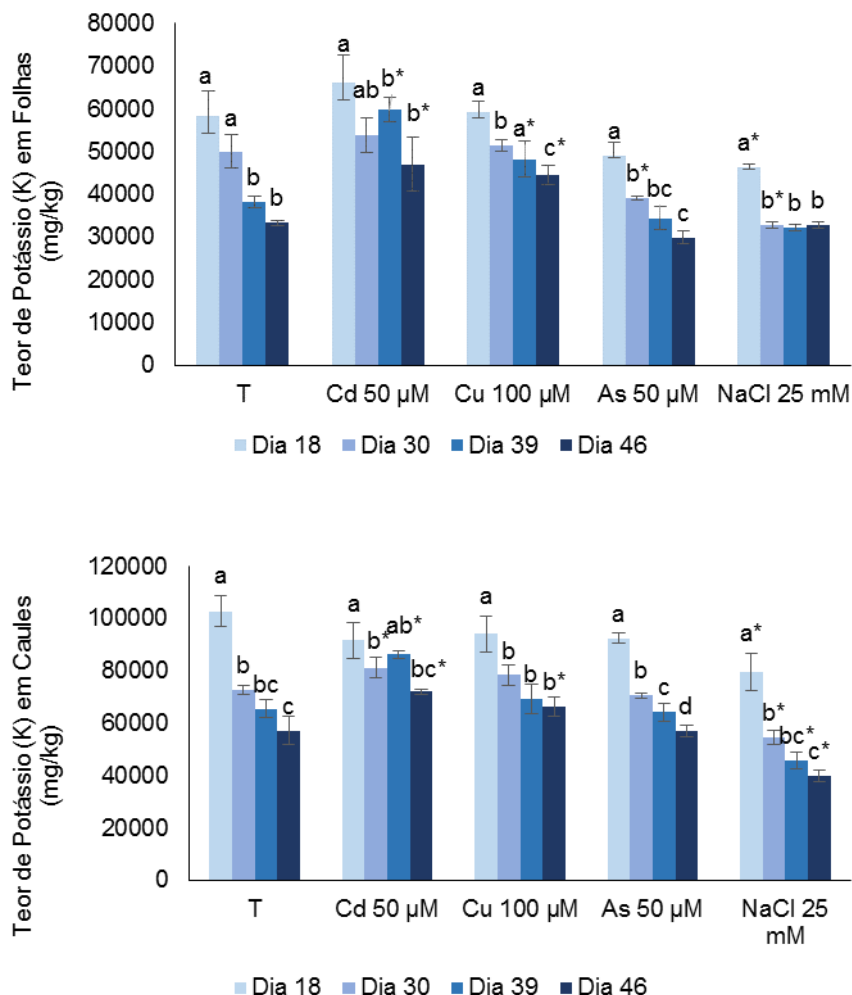


Figura 22 - Teor de K (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

Por análise da Figura 22 é possível concluir que em todas as modalidades, com exceção da modalidade de Cd, as plantas de colza diminuem o teor do mineral K ao longo do período de ensaio. No caso do K, as concentrações apresentam valores muito superiores nos caules em relação às folhas. Este resultado pode ser explicado pela elevada mobilidade de K nas plantas. As concentrações de K, que atingem o máximo na primeira recolha da modalidade Testemunha, confirmam a abundância deste elemento nas plantas. Os teores de K elevados nos caules, podem ser associados ao

conceito de consumo de luxo, explicado por Varennes (2003) com uma absorção de potássio superior à necessária para o metabolismo das plantas.

Em particular, as plantas contaminadas com Cd apresentam teores de K superiores no dia 39, tanto para caules como para folhas, aumentando a absorção de K nos tecidos das plantas.

4.4.2.9. Sódio

O teor de Na nas plantas de colza (folhas e caules) ao longo do período de contaminação apresenta-se na Figura 23.

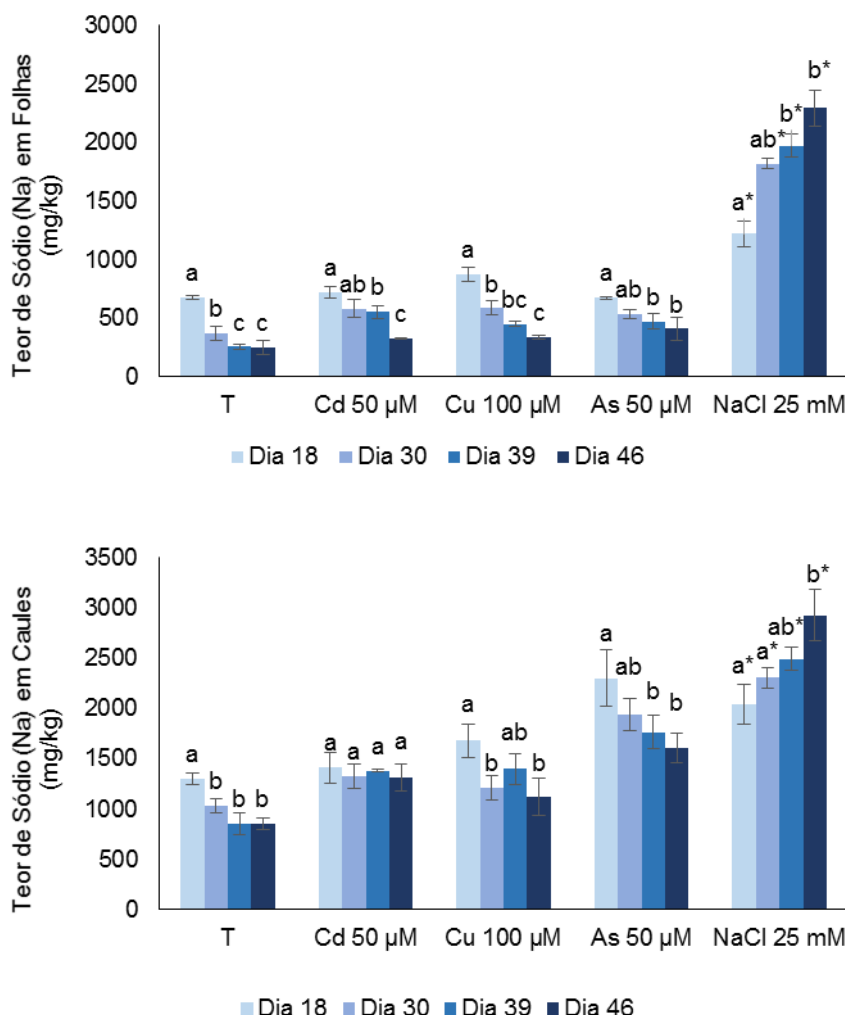


Figura 23 - Teor de Na (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

O teor de Na nas plantas de colza demonstra um padrão homogêneo em todas as modalidades, com exceção da modalidade de NaCl, como era de esperar. No decorrer dos dias de ensaio, a concentração de Na diminui e verificam-se valores de concentração superiores nos caules comparativamente com as folhas, apesar desta diferença não ser tão acentuada como no macronutriente K.

A modalidade de NaCl apresenta uma tendência contrária às restantes. A concentração de Na aumenta com os dias de exposição apresentando o teor máximo no dia 46 de contaminação. Apesar dos elevados teores de sódio registados, as plantas de colza podem considerar-se tolerantes. O principal sintoma verificado nas plantas desta modalidade foi o atraso no crescimento e o desenvolvimento tardio de vagens e sementes. Contudo, estas plantas registaram um teor de clorofila elevado, sem danos ao nível foliar.

Ao nível das sementes, as plantas sujeitas à maior concentração de Na produziram sementes cujo valor em Na determinado igualou as 2340,8 mg de Na por kg de MS de sementes enquanto na modalidade Testemunha o teor em Na foi igual a 84,10 mg de Na por kg de MS. A colza apresenta assim um potencial elevado para acumulação de Na nas sementes, havendo uma translocação considerável deste elemento, por todos os componentes da planta.

4.4.2.10. Zinco

A Figura 24 apresenta os resultados obtidos para a concentração de Zn em folhas e caules contaminados com EPT e sujeitos a salinidade.

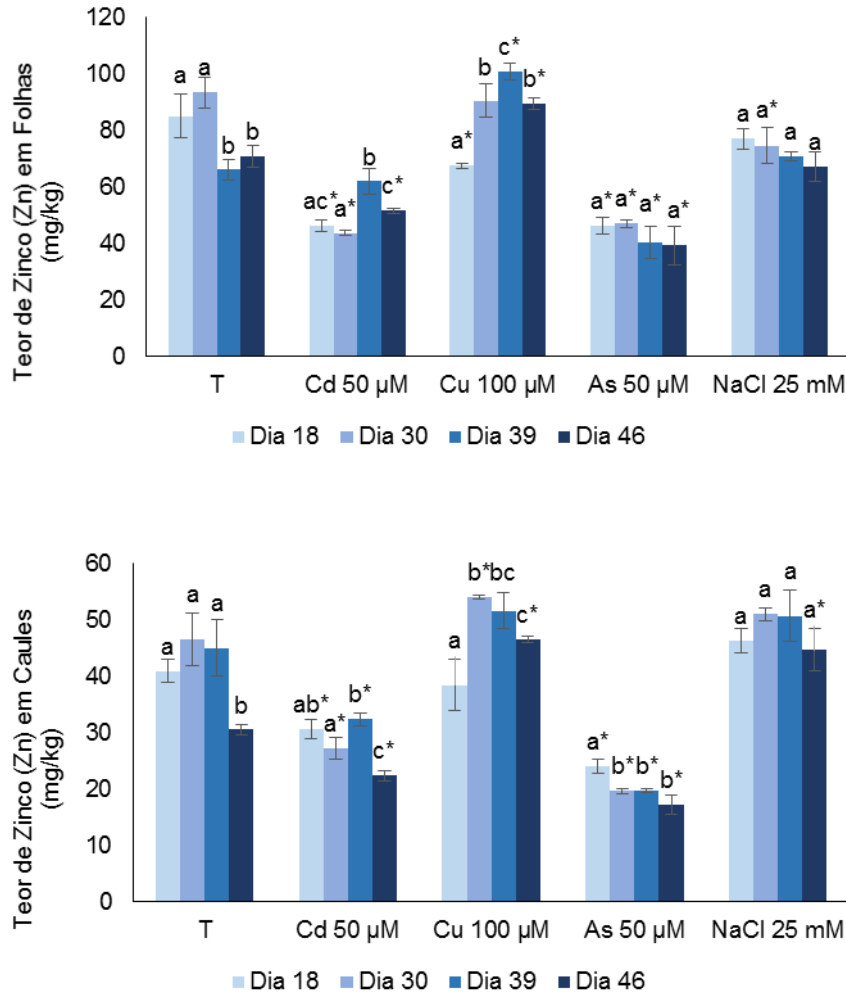


Figura 24 - Teor de Zn (mg/kg MS) em folhas e caules de plantas de colza, durante 46 dias de contaminação. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de EPT ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diversas concentrações EPT ou NaCl e a Testemunha para um dado dia; $n=3$.

De um modo geral, a concentração deste nutriente revela-se superior na parte área da planta, apesar da diferença entre os componentes não ser muito significativa.

As modalidades que mais parecem afetar a absorção de Zn pelas plantas de colza são aquelas contaminadas com Cd e As, onde o teor de Zn é claramente inferior. Isto pode ser o resultado da competição entre o Zn e os EPT Cd e As. Ainda que estes teores não ultrapassem o limite inferior considerado para a absorção de Zn, 25 mg/kg de MS, em

grande escala, pode verificar-se que a presença de As é a que mais afeta a assimilação deste micronutriente pelas plantas (em particular os caules). O crescimento mais demorado das plantas contaminadas com As pode ser explicado pela menor absorção de Zn, uma vez que a deficiência pode afetar o crescimento normal das plantas.

Relativamente aos elementos Cu e NaCl, estes parecem acompanhar a tendência da modalidade Testemunha, pelo que não afetam a absorção de Zn pelas plantas de colza.

4.5. Avaliação do efeito da contaminação na peroxidação de lípidos

Na Figura 25 representam-se os gráficos correspondentes ao teor de MDA presente nas folhas das plantas de colza.

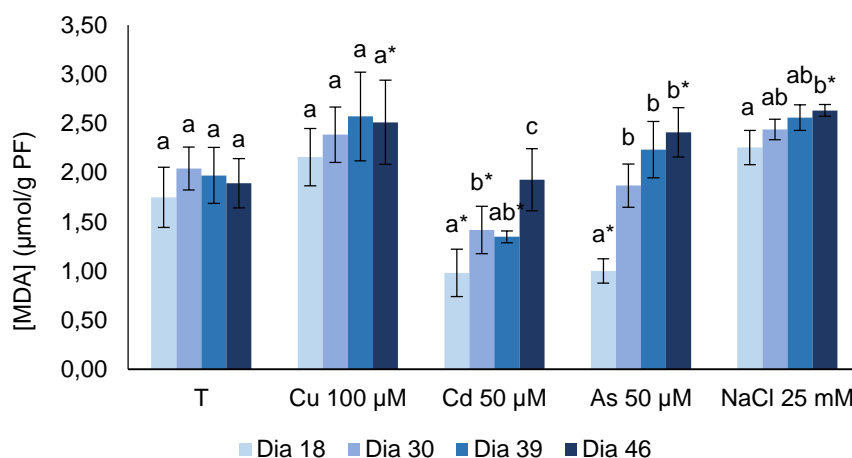


Figura 25 - Concentração média de MDA formado nas folhas das plantas em estudo após contaminação com Cu, Cd, As e NaCl, durante 46 dias. As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 M, Cd 50 M, As 50 e NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

A produção de MDA pelas plantas de colza revela-se assimétrica quando comparadas as diferentes modalidades de ensaio. Numa análise global, pode afirmar-se que nas modalidades estudadas, as maiores concentrações de MDA destacam-se na contaminação com cobre e cloreto de sódio, ou seja, será onde ocorre maior peroxidação lipídica.

Nas folhas contaminadas com As verifica-se uma tendência crescente da destruição lipídica, aumentando o teor de MDA proporcionalmente com os dias de contaminação.

No caso da modalidade de Cd 50 μM a concentração de MDA é sempre inferior à modalidade Testemunha. A explicação para os teores de MDA na modalidade de Cd serem inferiores aos da modalidade Testemunha não é evidente. Contudo, é de salientar que nas plantas onde não houve exposição a elementos tóxicos e salinidade (Testemunha), os níveis de MDA mantêm-se praticamente constantes entre as colheitas. Apesar dos teores de MDA serem inferiores nas plantas expostas ao Cd, é visível um aumento do MDA celular no decorrer do tempo de exposição, mas sem exceder os níveis normais observados na testemunha.

Na comparação entre os diferentes dias das colheitas, a destruição lipídica é superior nos dias 39 e 46 de contaminação. Apenas a modalidade Cu apresenta pequenas

oscilações entre a 3ª e 4ª colheita. Esta variação pode ser explicada pela ativação de um sistema de defesa celular. Por outro lado, esta oscilação pode ter na sua génese uma percentagem de erro experimental, uma vez que tendencialmente há sempre peroxidação lipídica elevada na presença deste elemento.

4.6. Avaliação do efeito da contaminação na produção de peróxido de hidrogénio

O teor de peróxido de hidrogénio, µg/g de peso fresco, nas folhas das plantas de colza, representa-se na Figura 26.

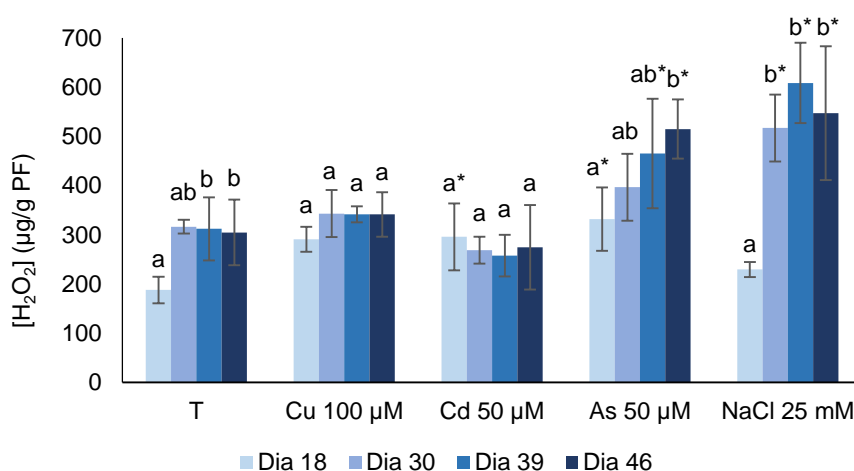


Figura 26 – Concentração média de H_2O_2 produzido nas folhas das plantas de colza, após contaminação com Cu, Cd, As e NaCl, durante 46 dias de exposição. As letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das diferentes colheitas para cada modalidade (T, Cu 100 µM, Cd 50 µM, As 50 µM, NaCl 25 mM). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à modalidade Testemunha, $n=3$.

Na análise do gráfico representado na Figura 26 é visível que as concentrações de H_2O_2 foram superiores nas modalidades de As e de NaCl, encontrando-se assim as maiores diferenças comparativamente com a modalidade de Testemunha. Também nestas modalidades se podem observar as maiores diferenças entre os dias de colheitas, havendo uma tendência crescente para a maior produção de H_2O_2 no decorrer do período de exposição.

As folhas das modalidades de Cu e Cd apresentam concentrações de H_2O_2 muito homogéneas, pelo que se pode afirmar que nas plantas de colza, estes elementos provocam efeitos semelhantes no que diz respeito à produção desta espécie de ERO. Pela análise dos resultados destas modalidades, é visível a ausência de diferenças significativas quando comparadas com a modalidade Testemunha.

De um modo geral, a presença de As e NaCl parece influenciar a produção de H_2O_2 nas folhas, ao contrário dos metais Cu e Cd que mantêm concentrações de H_2O_2 constantes ao longo do tempo de exposição. Na comparação com os resultados de MDA (ver 4.5) pode afirmar-se que, a produção de H_2O_2 acompanha a peroxidação lipídica nas cinco modalidades, principalmente no período de exposição mais longo (dia 46).

5. Conclusões

Depois das determinações feitas e dos resultados obtidos é possível retirar as seguintes conclusões:

Ao nível da biomassa as plantas contaminadas com As manifestaram algumas oscilações no seu desenvolvimento, uma vez que no início as plantas não acompanharam a modalidade Testemunha, mas no fim do ciclo vegetativo estas foram as que produziram flores e sementes mais depressa. Por sua vez, as plantas de colza sujeitas a condições de salinidade foram as que manifestaram mais problemas ao nível do crescimento e desenvolvimento regular da planta. Os efeitos da salinidade nas plantas foram visíveis ao longo do período de ensaio e foi notório o crescimento lento e a produção de flores e sementes tardia. As contaminações com Cd e Cu não afetaram a biomassa das plantas pelo que se pode concluir que estes metais não assumem efeitos ao nível do crescimento das plantas de colza. Contudo, numa fase final do ensaio de rega, estas modalidades demonstraram efeitos diferentes ao nível de flores e sementes. A modalidade de Cu produziu flores, mas a produção de sementes foi nula. As plantas evidenciaram sinais fortes de contaminação e o seu desenvolvimento estagnou, o que impossibilitou a formação de sementes e a avaliação do seu conteúdo mineral. Por sua vez, nas plantas contaminadas com Cd, o desenvolvimento de flores, a formação de vagens e de sementes foi tardio.

O parâmetro fisiológico matéria seca não apresentou resultados com diferenças elevadas nas diferentes modalidades. Observou-se uma tendência crescente na percentagem de matéria seca, inclusive na modalidade Testemunha.

O teor de clorofila determinada por *Hansatech* demonstrou uma variância significativa nas 5 modalidades. As plantas sujeitas à contaminação por Cu e Cd desenvolveram cloroses e necroses avançadas nos últimos dias de ensaio, condicionando o teor de clorofila. Esta diferença foi mais significativa nas plantas com Cu. Por análise do conteúdo mineral é possível verificar que a contaminação com Cd e Cu condicionou a absorção de Fe, o que evidenciou danos graves ao nível foliar e no desenvolvimento regular das plantas de colza. Por sua vez as plantas da modalidade de NaCl demonstraram níveis de clorofila elevados. Este resultado deriva do excesso de ião Na^+ , que provoca uma redução no crescimento, e simultaneamente, por expansão celular, um aumento da área foliar e consequentemente uma concentração de clorofila superior.

No que diz respeito às concentrações de EPT e de NaCl determinadas estas devem ser analisadas consoante a absorção no substrato, em caules, em folhas e por fim nas

sementes. Em todas as modalidades a tendência de acumulação segue a seguinte ordem: Substrato > Folha > Caule > Semente, com exceção das plantas da modalidade de NaCl onde os caules e sementes têm um teor de Na⁺ mais elevado comparativamente com as folhas. A menor concentração nos caules evidencia o papel de agente condutor de minerais para a parte aérea da planta.

A máxima absorção de elemento tóxico pela colza dá-se ao nível foliar, onde se destaca o Cd com um teor de 290,2 mg/kg MS de folhas, seguindo-se o Cu com 61 mg/kg MS e o As com 2,8 mg/kg MS. O teor de cada elemento foi ainda determinado nas sementes sendo o seu valor muito baixo, quando comparada a ordem de grandeza nos outros órgãos da planta. No entanto, este facto não deve ser ignorado. Em produções em larga escala, com solos contaminados, estes valores poderão tomar outras proporções pondo em causa a utilização desta cultura como forragem para alimentação animal ou mesmo como produto de biodiesel – promovendo a libertação de metais tóxicos para a atmosfera.

A presença de Na, em condições de salinidade, revela-se um fator de influência no crescimento das plantas de colza, associando-se também um teor elevado na absorção deste elemento nos caules, da ordem de 2926 mg/kg MS. O teor de Na acumulado nos vários órgãos das plantas de colza vem comprovar a sua tolerância a condições de salinidade, contudo é sempre notório o retardamento no desenvolvimento da planta.

Os Quadros 7 e 8 apresentam a variação dos elementos minerais, na comparação das modalidades contaminadas com a Testemunha, onde "↑" indica o aumento de absorção, "↓" a diminuição na absorção do elemento e "=" a igualdade em termos de absorção do mineral.

Quadro 7 - Efeito dos EPT e da Salinidade no teor mineral das folhas

Modalidade	Efeito no teor de mineral nas Folhas							
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Cu	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Cd	↑	↑	=	↑	↑	=	↑	↓
As	↑	↑	↓	=	↑	↓	↑	↓
NaCl	=	↑	=	=	=	↓	↑	=

Quadro 8 - Efeito dos EPT e da Salinidade no teor mineral dos caules

Modalidade	Efeito no teor de mineral nos Caules							
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Cu	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Cd	=	=	↓	↑	=	↓	↑	↓
As	↓	↑	↓	=	=	↓	↑	↓
NaCl	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑

No conteúdo mineral as modalidades de ensaio apresentam resultados distintos, concluindo-se que:

- ✓ O Cu afeta a concentração do mineral Fe em toda a planta e incrementa a concentração dos restantes minerais;
- ✓ O Cd afeta o teor de Zn nas folhas e caules e de Fe nos caules, estimulando a absorção de Na, K, Ca, Mg, Mn e Cu;
- ✓ O As afeta a concentração de Zn, Mn e Fe nas folhas e caules e de Ca apenas nos caules, acumulando Na e Cu em toda a planta;
- ✓ O NaCl afeta a concentração de Mn e Cu nas folhas, mantendo os restantes minerais semelhantes à Testemunha. Nos caules, há uma diminuição de K, Ca, Mg e Mn.

Ao nível celular, o teor de MDA formado difere entre as várias modalidades, destacando-se a maior peroxidação de lípidos nas células das plantas contaminadas com Cu e expostas a NaCl, o que sugere que estes elementos causam um efeito de stresse nas plantas de colza. Por outro lado, nas plantas da modalidade de As é evidente o aumento gradual no decorrer do período de exposição, o que aponta para a peroxidação lipídica mais acentuada para períodos de contaminação mais longos. Por fim, o caso da modalidade Cd revela não haver uma produção de MDA tão elevada como se esperava, no entanto as plantas contaminadas apresentam maior teor de MDA para períodos de exposição mais prolongados. Em todas as modalidades de ensaio, a produção de MDA difere da modalidade Testemunha, uma vez que nesta situação, o teor de MDA se mantém constante.

Quanto ao stresse oxidativo, a produção de H_2O_2 destaca-se nas modalidades de As e NaCl, enquanto as modalidades de Cu e Cd demonstram concentrações de H_2O_2 semelhantes à modalidade Testemunha. Desta forma pode concluir-se que ao nível celular e na produção de H_2O_2 , o As e o NaCl são os elementos que mais condicionam o equilíbrio das plantas de colza, originando stresse oxidativo. A produção de ERO, em

particular o H_2O_2 , é influenciada pela presença de As e NaCl na solução de rega, o que desencadeia um mecanismo de defesa das plantas de colza na presença de condições adversas.

Pode assim concluir-se que, a tolerância das plantas de colza aos EPT pode ser uma vantagem na recuperação de solos contaminados. Durante o estudo, a colza demonstrou um comportamento característico de espécies hiperacumuladoras e tolerantes à salinidade, com alguns danos ao nível estrutural e fisiológico. Os resultados obtidos no ensaio apontam para uma acumulação de As, Cd e Cu em todos os tecidos da planta, com maior expressão nas folhas. Deste modo, os parâmetros avaliados refletem um efeito negativo no ciclo de produção da colza sempre que, ocorra a sua utilização como planta produtora de óleo para biodiesel, ou de forragem para alimentação animal associados à fitorremediação.

5.1. Propostas Futuras

Para dar continuidade ao estudo do efeito de elementos potencialmente tóxicos nas plantas de colza, em trabalhos futuros, propõe-se a determinação da atividade enzimática de forma a perceber o comportamento das enzimas em situações de stresse oxidativo – reforçando os resultados obtidos ao nível da peroxidação de lípidos e na produção de peróxido de hidrogénio.

Num próximo ensaio com plantas de colza em solo poderão ser monitorizados fatores relacionados com propriedades físicas e químicas do solo, como a textura e o pH, que podem ser condicionantes na absorção dos minerais presentes no solo. Propõe-se também que sejam analisadas as raízes das plantas de colza de forma a perceber as diferenças encontradas no tempo de exposição a elementos tóxicos.

Dada a importância da cultura da colza como forragem para alimentação animal, deverão ser feitas análises toxicológicas, para perceber quais os níveis a que podem ser expostos os animais, no consumo desta cultura.

O estudo da colza como planta de fitorremediação deve ser aprofundado e para isto é necessário um tempo de exposição mais longo, para testar o potencial desta cultura na remoção de metais pesados em solos contaminados, numa escala real.

Por último, como proposta futura sugere-se a produção de óleo para biodiesel através das sementes produzidas e a determinação do teor dos elementos tóxicos no biodiesel produzido. Este passo será importante para perceber a possível libertação destes metais para a atmosfera.

6. Referências Bibliográficas

- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S. 2008. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. *Journal of Plant Biology*.51: 167-173.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2005. Pre-sowing seed treatment – A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Adv. Agron.* 88:223–271.
- Baptista, S. 2009. Avaliação da resposta ao stress oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Clemens, S.; Palmgreen, M.; Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Review. Plant Science.* 7:309-315
- Di Toppi , L. S. & Gabrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany.* 41:105-130.
- Duffus, J.H. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* Vol. 74, No. 5, pp. 793-807
- El Bassam, N. 1998. Energy plant species. James & James (Science Publishers) Ltd, Londres, Reino Unido, 3:23, 7:206
- Ent, A., A. M. Baker, R. Reeves, A. J. Pollard, and H. Schat. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* 362 (1-2):319-334.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* Bentham Science Publishers Ltd. 1:529-539.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., Jones, C.A. 2011. Growth and mineral nutrition of field crops, 3ª edição. CRC Press. 5:125-153, 6:175-189.
- FAO.1978..A.provisional.methodology.for.soil.degradation.assessment..Rome..84.p.

- Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, A., Ördög, A., Szepesi, A., Gémes, K., Laskay, G., Erdei, L., Kolbert, Z. 2013. Physiological and morphological responses to root systems of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier. 94:179-189.
- Ferreira, I. A, Q. M. 2009. Adaptação das cultivares de Inverno de colza às condições ecológicas de Trás-os-Montes. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Bragança.
- Finnegan, P.M., Chen, W. 2012. Arsenic Toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, Vol.3, 182.
- Ghnaya, A.B., Charles, G., Hourmant, A., Hamida, J.B., Branchard, M. 2009. Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus Biologies*. 332: 363-370.
- Gomes, C. 1998. Estudo do efeito do cádmio no Desenvolvimento de algumas espécies vegetais. Relatório Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms of heavy metals for detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53:1-11.
- Hirt, H., Shinozaki, K. 2004. Plant Responses to Abiotic Stress. Springer. 2-7; 9:241-261
- Kabata-Pendias A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants 4ª Edição. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Li, X., Li, F., Singh, B., Cui, Z., Rengel, Z. 2006. Decomposition of maize straw in saline soil. *Biol Fertil Soils*, Vol.42, pp. 366–370
- Lin, R.; Wang, X.; Luo, Y.; Du, W.; Guo, H.; Yin, D. 2007. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidants system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*. 69:89-98.
- Maksymiec, W. & Krupa, Z. 2006. The effects of short-term exposure to Cd, excess Cu ions and jasmonate oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*. 57:184-197.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2ª edição. Academic Press. Londres. 889p.

- Martin, S., Llugany, M., Barceló, J., Poschenrieder, C. 2012. Cadmium exclusion a key factor in differential Cd-resistance in *Thlaspi arvense* ecotypes. *Biol Plant.* 56: 729-734.
- McGrath, S. P., Zhao, F.J., Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv Agron.* 75:1–56.
- Mithofer, A., Schulze, B., Boland, W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566:1-5.
- Mourato, M., Reis, R., Louro, L.M. 2012. Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity, Capítulo 2 em *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. Ed. Giuseppe Montanaro e Bartolomeo Dichio, InTech, 388 pp.
- Nagajyoti, P.; Lee, K.; Sreekanth, T. 2010. Heavy Metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters.* 8:199-216.
- Oh, S.-H., Cho, S.-W., Kwon, T.-H., and Yang, M.-S. 1996. Purification and characterization of phytoferritin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29: 540–544.
- Pinto, F.R. 2011. Avaliação da resposta ao stress oxidativo induzido por cádmio em plantas de espinafre *Spinacea oleracea* L.. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Reichman, S. M. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity: a review focusing on copper, manganese and zinc. *Australian Minerals & Energy Environment Foundation*, 54.
- Rossi, G., Figliolia, A., Socciarelli, S., Pennelli, B. 2002. Capability of *Brassica napus* to Accumulate Cadmium, Zinc and Copper from Soil, *Acta Biotechnol.* 22, 1-2, 133-140.
- Sanders, D., Brownlee, C., and Harper J. F. 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691–706.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643–668.
- Sandalio, L. M.; Dalurzo, H. C.; Gomez, M.; Romero-Puertas, M. C.; Del Rio, L. A. 2001. Cadmium – induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany. Elsevier.* 52:2115-2126.
- Sarkar, B. 2002. Heavy Metals in the Environment, Marcel Dekker, Inc. USA.

Shanker, A.K., Venkateswarlu, B., 2011. Abiotic stress in plants – Adaptations and mechanisms. InTech. 2:22-27; 8:172-185.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, 3ª edição. Artmed. 5: 68-79.

Vangronsveld, J., Clijsters, H. 1994. Toxic effects of metals. In Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity, ed. M. E. Farago, 149-177. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

Varennas, A. 2003 Produtividade dos Solos e Ambiente. *Escolar Editora*.

Wang, Q.R., Liu, X.M., Cui, Y.S., Dong, Y.T, Christie, P. 2002. Responses of legume and non-legume crop to heavy metals in soils with multiple metal contamination. Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering, 37(4):611-621

Witters, N., Mendelsohn, R.O., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., *et al.* 2012. Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I:energy production and carbon dioxide abatement. Biomass and Bioenergy 39:454-469.